

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BERNARDO FERMINO CORREIA DE LIMA

**ESTUDO DO PAPEL DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DA
SUBSTÂNCIA NEGRA NO CONDICIONAMENTO DE LUGAR
COM SACAROSE E QUININO**

CURITIBA

2014

BERNARDO FERMINO CORREIA DE LIMA

**ESTUDO DO PAPEL DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DA
SUBSTÂNCIA NEGRA NO CONDICIONAMENTO DE LUGAR
COM SACAROSE E QUININO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia, no curso de Pós-Graduação
em Farmacologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

CURITIBA

2014




Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



1 **ATA DO JULGAMENTO DA 96ª DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

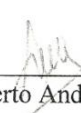
2 Ao vigésimo quarto dia do mês de junho do ano de dois mil e quatorze, às quinze horas, no
3 Auditório do Departamento de Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade
4 Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de
5 autoria do pós-graduando **BERNARDO FERMINO CORREIA DE LIMA**, intitulada
6 "ESTUDO DO PAPEL DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DA SUBSTÂNCIA
7 NEGRA NO CONDICIONAMENTO DE LUGAR COM SACAROSE E QUININO", sob
8 orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha e composta pelos professores Prof. Dr. Cláudio
9 da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada
10 (Fisiologia - UFPR) e Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR). A Banca
11 Examinadora iniciou os trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor
12 oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguido durante trinta minutos por cada um dos
13 membros da Banca e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No
14 final da sessão, a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:
15 APROVADO. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-
16 Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi aprovado. Para a publicação, o trabalho
17 deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Nada
18 mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a
19 presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca
20 Examinadora em Curitiba, 24 de junho de 2014.



Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada - Fisiologia - UFPR)



Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia - UFPR)

PARECER

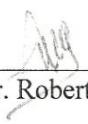
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "ESTUDO DO PAPEL DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA NO CONDICIONAMENTO DE LUGAR COM SACAROSE E QUININO", de autoria do pós-graduando BERNARDO FERMINO CORREIA DE LIMA, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha e composta pelos professores: Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada (Fisiologia - UFPR) e Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Em Curitiba, 24 de junho de 2014.



Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada - Fisiologia - UFPR)



Prof. Dr. Roberto Andreatini (Farmacologia – UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais, Lurdes Correia de Lima e Valdevino Antunes de Lima, por seu apoio para alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio da Cunha, pela oportunidade e ensinamentos.

Ao Departamento de Farmacologia pela oportunidade de alcançar este objetivo.

Aos membros da banca pelo aceite e disponibilidade.

A toda minha família, especialmente aos meus pais, Lurdes Correia de Lima e Valdevino Antunes de Lima, e ao meu tio João Correia por seu apoio.

Ao meu amigo Alexander Gomez Acosta por seu apoio em todas as fases de desenvolvimento desta pesquisa, tanto na teoria quanto na prática, pela compreensão em todos os momentos difíceis deste trabalho.

À minha amiga Paola Sanchez pelos ensinamentos e momentos divertidos que vivemos no Departamento de Farmacologia.

Ao meu amigo Tiago Zamineli pelos ensinamentos.

À minha companheira Helba Cirino de Souza Barbosa por seu apoio e compreensão.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente à farmacêutica Silvia Cordazzo Genari, pelo auxílio técnico e simpatia de pessoa que é.

Às colegas de laboratório, Suelen Boschen, Laura Pulido, Amanda Fiorenza e Janaína Barbiero, pelo auxílio e ensinamentos fundamentais na realização deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

RESUMO

É ainda controverso se diferentes populações de neurônios dopaminérgicos desempenham um papel na aprendizagem associativa apetitiva e aversiva. No presente trabalho, mostramos que a lesão parcial bilateral da substância negra pars compacta (SNc) de ratos induzida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP, 200 µg/por lado) ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 3 µg/por lado) prejudica a tarefa de aversão condicionada de lugar, mas não a preferência condicionada de lugar.

As expressões faciais dos ratos MPTP e 6-OHDA após comerem ou experimentarem os pellets de sacarose e quinino, bem como seus comportamentos motor e emocional no campo aberto foram similares aos dos ratos SHAM. Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase mostrou que houve uma redução significativa e equivalente no número de neurônios dopaminérgicos da SNc anterior e posterior nos ratos MPTP e 6-OHDA, mas não na VTA. Além disso, cromatografia líquida de alto desempenho com detecção eletroquímica (HPLC-ED) confirmou uma redução significativa e equivalente dos níveis de dopamina estriatal em ambos os grupos lesionados.

De forma geral, estes dados mostram que: (i) a perda parcial de neurônios dopaminérgicos da SNc prejudica a aprendizagem associativa aversiva, mas a apetitiva; (ii) diferentes populações de neurônios dopaminérgicos têm diferente sensibilidade aos efeitos tóxicos do MPTP e 6-OHDA, o que as torna boas ferramentas para segregar estas populações de neurônios. Esta descoberta tem importantes implicações na pesquisa básica e aplicada da doença de Parkinson, adição, aprendizagem e memória, e outras condições onde a dopamina estriatal está implicada.

Palavras-chave: Estímulos apetitivos e aversivos. Substância negra pars compacta. Neurônios dopaminérgicos. Estriado dorsal.

ABSTRACT

It is controversial whether different populations of midbrain dopamine (DA) neurons play a role in appetitive and aversive associative learning. Here, we show that partial bilateral lesions of DA neurons in the rat substantia nigra pars compacta (SNc) induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 200 µg/side) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 3 µg/side) impaired conditioned place aversion (CPA) without affecting conditioned place preference (CPP).

Importantly, MPTP and 6-OHDA rats facial expressions after tasting sucrose or quinine, motor and emotional behaviors in the open field test were not different from the SHAM rats. Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase showed a significant and equivalent reduction in the number of DA neurons of the anterior and posterior SNc in both MPTP and 6-OHDA rats, but not in the VTA. In addition, high performance chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) showed significant and equivalent reduction in the striatal DA levels in both lesioned groups.

Overall, these data show that: (i) the partial loss of dopamine neurons in the SNc impairs aversive associative learning, but not the appetitive learning; (ii) different populations of dopamine neurons have different sensitivity to the toxic effects of the MPTP and 6-OHDA, which makes them good tools to tease apart these dopamine neurons subpopulations. This finding has important implications in basic and applied research of Parkinson's disease, addiction, learning and memory, and other conditions where striatal DA is implicated.

Key-words: Appetitive and aversive stimuli. Substantia nigra pars compacta. Dopamine neurons. Dorsal striatum.

LISTA DE SIGLAS

CS	–	Estímulo condicionado (do inglês conditioned stimulus)
DA	–	Dopamina ou dopaminérgico
GP	–	Globo pálido
Gpe	–	Globo pálido externo
Gpi	–	Globo pálido interno
HPLC-ED	–	Cromatografia líquida de alto desempenho com detecção eletroquímica
6-OHDA	–	6-hidroxidopamina
MPTP	–	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAc	–	Núcleo accumbens
SHAM	–	O mesmo que falsamente lesado
SNC	–	Substância negra pars compacta
SNr	–	Substância negra pars reticulata
STN	–	Núcleo subtalâmico
US	–	Estímulo incondicionado (do inglês unconditioned stimulus)
VTA	–	Área tegmentar ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. FUNCIONAMENTO DOS NÚCLEOS DA BASE	13
1.1.1. O CIRCUITO CÓRTICO-ESTRIATAL.....	13
1.1.2. MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA DO CIRCUITO CÓRTICO-ESTRIATAL.....	16
1.2. APRENDIZAGEM ASSOCIATIVA: OS CONDICIONAMENTOS CLÁSSICO E INSTRUMENTAL.....	18
1.3. DOPAMINA: APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE PROCEDIMENTOS.....	21
2- OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. ARTIGO CIENTÍFICO	25
4. DISCUSSÃO.....	52
5. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Os núcleos da base são formados por estruturas telencefálicas subcorticais e estruturas do diencéfalo e mesencéfalo que recebem aferências de todo o córtex cerebral e enviam eferências ao córtex frontal via tálamo e a núcleos motores do tronco encefálico (ALEXANDER, *et al.*, 1990; DELONG, 1990; PARENT e HAZRATI, 1995). Os componentes do circuito dos núcleos da base são: o corpo estriado, que em primatas é formado pelo núcleo caudado, putâmen (estriado dorsal, o qual é ainda dividido em estriado dorsomedial (caudado) e estriado dorsolateral (putâmen)) e pelo núcleo accumbens (estriado ventral, o qual é dividido em núcleo accumbens core e shell); o globo pálido, dividido em segmentos externo (GPe), interno (Gpi) e pálido ventral, sendo que ambos os núcleos (estriado e globo pálido) estão localizados no telencéfalo; o núcleo subtalâmico (STN), localizado no diencéfalo; a substância negra, localizada no mesencéfalo, a qual está dividida em pars compacta (SNc) e pars reticulata (SNr) e a área tegmentar ventral (VTA) (JOEL e WEINER, *et al.*, 1994; TISCH, *et al.*, 2004; IKEMOTO, 2007; NICOLA, 2007; REDGRAVE, *et al.*, 2008; ÜNAL, *et al.*, 2011; DA CUNHA, *et al.*, 2012).

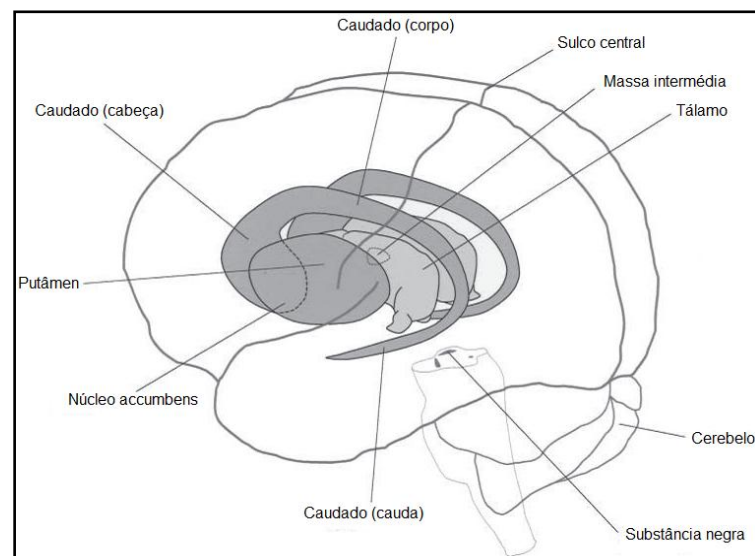


Figura 1. Núcleos da base. O núcleo subtalâmico não é mostrado nesta imagem, mas o mesmo se encontra logo abaixo do tálamo, conforme indica o seu nome. HERRERO, *et al.*, 2002.

Os núcleos da base são classicamente associados às funções motoras, pois distúrbios no seu funcionamento levam a prejuízos motores. Na doença de Parkinson, por exemplo, onde há uma perda de neurônios dopaminérgicos da SNc, o paciente apresenta dificuldade para iniciar a marcha e tremor em repouso (LANGSTON, *et al.*, 1987; SULZER, 2007; ARIAS-CARRIÓN, *et al.*, 2009; PARENT e PARENT, 2009). Outro exemplo de distúrbio motor causado pelo mau funcionamento dos núcleos da base é a doença de Huntington, na qual o paciente apresenta movimentos involuntários rápidos, irregulares e sem finalidade, conhecidos como coreia (BERARDELLI, *et al.*, 1999; RAYMOND, *et al.*, 2011; VICTORSON, *et al.*, 2014).

Todavia, tem-se tornado cada vez mais evidente que os núcleos da base não estão envolvidos apenas em aspectos puramente motores, também desempenham funções cognitivas importantes. Estão envolvidos em processos de aprendizagem, memória e tomada de decisões, onde selecionam ações adequadas de acordo com o contexto (GAMBARYAN e SARKISYAN, 1983; PHILLIPS e CARR, 1987; GRAYBIEL, 1995; MIDDLETON e STRICK, 2000; PACKARD e KNOWLTON, 2002; SEGER, 2006; DOYON, *et al.*, 2009; HELMICH, *et al.*, 2009; FOERDE e SHOHAMY, 2011). Também estão envolvidos com aspectos motivacionais e emocionais (KELLEY, 2004; KELLEY, *et al.*, 2005; REDGRAVE, *et al.*, 2008; REDGRAVE, *et al.*, 2011; DA CUNHA, *et al.*, 2012; BALDO, *et al.*, 2013).

Pacientes com doença de Parkinson (BOWERS, *et al.*, 2006; KIRSCH-DARROW, *et al.*, 2006; OGURU, *et al.*, 2010; MATSUI, *et al.*, 2013; YAMANISHI, *et al.*, 2013; GARCIA-RUIZ, *et al.*, 2014) ou doença de Huntington (JOEL, 2001; PARADISO, 2008; AZIZ, *et al.*, 2010; NOVAK, *et al.*, 2012; HARRINGTON, *et al.*, 2014), além de apresentarem distúrbios motores, também apresentam déficits cognitivos, como problemas de aprendizagem e memória, alterações motivacionais e emocionais. Além disso, os núcleos da base estão envolvidos em outros distúrbios, como o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (SCHNEIDER, *et al.*, 2006; EMOND, *et al.*, 2009; DURSTON, *et al.*, 2011; PASSAROTTI e PAVULURI, 2011; LEISMAN, *et al.*, 2014), a esquizofrenia (WALTZ, *et al.*, 2009; HARVEY, *et al.*, 2010; GRADIN, *et al.*, 2011; STRAUSS, *et al.*, 2014; DIWADKAR, *et al.*, 2014) e a adição a drogas (ROBINSON e BERRIDGE, 2000; VETULANI, 2001; CHAO e

NESTLER, 2004; NESTLER, 2005; VOLLSTÄDT-KLEIN, *et al.*, 2010; CHEN , *et al.*, 2011; EVERITT e ROBBINS, 2013).

Mas como os núcleos da base podem estar envolvidos em tantas funções encefálicas, tantos distúrbios? Eles contam com o auxílio de um complexo circuito que integra informações motoras, sensoriais, motivacionais e emocionais vindas dos córtices motor, sensorial, associativo e límbico (BALLEINE *et al.*, 2009, MIYACHI, 2009; REDGRAVE, *et al.*, 2011). Veremos agora como os núcleos da base funcionam.

1.1. FUNCIONAMENTO DOS NÚCLEOS DA BASE

1.1.1. O CIRCUITO CÓRTICO-ESTRIATAL

O corpo estriado, assim chamado por causa dos axônios que o cruzam lhe dando um aspecto estriado, recebe amplas projeções glutamatérgicas de todas as áreas corticais, atuando, portanto, como a principal porta de entrada dos núcleos da base (HABER e CALZAVARA, 2009; CHAKRAVARTHY, *et al.*, 2010). Os principais alvos das projeções córtico-estriatais são os neurônios GABAérgicos do estriado conhecidos como neurônios espinhosos médios (MSNs, do inglês medium spiny neurons) por causa dos espinhos presentes em seus dendritos. Estes neurônios constituem aproximadamente 95% da população neuronal do estriado (CALABRESI, *et al.*, 2007). Suas extensas arborizações formam sinapses com interneurônios do estriado e com neurônios aferentes provenientes do córtex, do tálamo e mesencéfalo. Cada MSN recebe projeções convergentes de múltiplas áreas corticais. Além disso, alguns inputs corticais se projetam para interneurônios do estriado (aproximadamente 5% de sua população), os quais fazem sinapse com centenas de MSNs. Os neurônios corticais também se projetam diretamente para o núcleo subtalâmico, na chamada via hiperdireta (AGLIOTI, 1997; TISCH, *et al.*, 2004; CRITTENDEN e GRAYBIEL, 2011; GEFEN e SURMEIER, 2011; ÜNAL, *et al.*, 2011).

Os interneurônios estriatais podem ser colinérgicos ou GABAérgicos. Os interneurônios colinérgicos coexpressam receptores dopaminérgicos D2 (receptor acoplado às proteínas Gi/Go, que quando ativas, inibem a enzima adenilil ciclase e ativam a abertura de canais de potássio, respectivamente,

levando a inibição do neurônio) e D5 (receptor acoplado à proteína Gs, a qual possui um efeito excitatório sobre a enzima adenilil-ciclase e, portanto, ativa o neurônio) e modulam os neurônios espinhosos médios por meio de receptores muscarínicos M2 e M4 (receptor acoplado às proteínas Gi/Go, que quando ativas, inibem a enzima adenilil ciclase e ativam a abertura de canais de potássio, respectivamente, levando a inibição do neurônio) (BERGSON, *et al.*, 1995; HERSCH *et al.*, 1995; YAN e SURMEIER, 1996; ADLER, *et al.*, 2013). Os interneurônios colinérgicos são conhecidos como neurônios tonicamente ativos ou TANs (Tonically active neurons) e disparam espontaneamente em baixa frequência, de 2-10 Hz (GRAYBIEL, *et al.*, 1994). Os interneurônios GABAérgicos são ainda divididos em GABAérgicos que expressam parvalbumina, GABAérgicos que expressam calretinina e GABAérgicos que expressam óxido nítrico ou neuropeptídeo Y (GERFEN e SURMEIER, 2011). Os interneurônios que expressam parvalbumina são conhecidos como neurônios de disparo rápido ou FSIs (Fast-spiking interneurons) e disparam em frequências de 200-300 Hz (TEPPER e BOLAM, 2004; HUMPHRIES, *et al.*, 2010; ADLER, *et al.*, 2013).

Uma vez processada no estriado, a informação é enviada para as estações de saída dos núcleos da base, que são a SNr e o Gpi, por meio das projeções dos MSNs, as quais constituem as chamadas vias direta e indireta. (OBESO, *et al.*, 2008; DA CUNHA, *et al.*, 2009; CHAKRAVARTHY, *et al.*, 2010; CRITTENDEN e GRAYBIEL, 2011; DA CUNHA *et al.*, 2012). A via direta, também conhecida como via estriatonigral (NAKANO, 2000; KREITZER e MALENKA, 2008), projeta axônios diretamente para os núcleos da SNr e do Gpi, os quais possuem neurônios GABAérgicos que, quando ativos, inibem tonicamente os núcleos motores do tálamo. Desta forma, quando a via direta está ativa, há a inibição do GPI e da SNr, os quais, por sua vez, deixam de inibir o tálamo. Uma vez ativos, os neurônios talâmicos, que são glutamatérgicos, ativam o córtex frontal facilitando a seleção e execução de uma determinada ação. Por outro lado, os neurônios da via indireta, também conhecida como via estriatopalidal (NAKANO, 2000; KREITZER e MALENKA, 2008), projetam-se somente para o Gpe, que também possui neurônios GABAérgicos. Quando ativo, o GPe inibe tonicamente a SNr e o Gpi, que por sua vez, deixam de inibir os núcleos motores do tálamo. Assim, a via indireta,

por meio da inibição do GPe, desinibe o GPi e a SNr, os quais inibem os núcleos motores do tálamo, dificultando a seleção e execução de uma ação (AGLIOTI, 1997; HERRERO, *et al.*, 2002; GROENEWEGEN, 2003; SEGER, 2006; KREITZER e MALENKA, 2008; GRAHN, *et al.*, 2009; SMITH, *et al.*, 2009). Além disso, os neurônios do Gpe também se projetam para STN inibindo-o. O STN, o qual possui neurônios glutamatérgicos, envia projeções para o Gpe, SNr e GPi. Assim, a via indireta forma um circuito multissináptico entre o estriado e os núcleos de saída dos núcleos da base. Nicola (2007) propõe que o núcleo accumbens possui um circuito semelhante ao descrito acima (pertencentes ao estriado dorsal), com via direta e indireta se projetando para o pálido ventral, o qual está inibindo tonicamente o tálamo. Quando desinibido, o tálamo ativa o córtex facilitando a seleção de ações. Portanto, a atividade de diferentes regiões do neocórtex afeta a atividade dos núcleos da base, que, por sua vez, modulam o funcionamento do córtex frontal. (DELONG e WICHMANN, 2007; DELONG e WICHMANN, 2010; GERFEN e SURMEIER, 2011).

Como vimos acima, de acordo com o modelo clássico do funcionamento dos núcleos da base, a ativação da via direta facilitaria a execução de um movimento e a ativação da via indireta inibiria a execução de movimento. Entretanto, Cui, *et al.* (2013), por meio de técnicas de optogenética, observaram que ambas as vias (direta e indireta) estão ativas simultaneamente durante a iniciação de uma ação motora, estando, provavelmente, a via direta selecionando a ação apropriada e a via indireta inibindo as ações concorrentes (DA CUNHA *et al.*, 2009).

Surmeier (2013) propõe a metáfora segundo a qual os núcleos da base atuam como um “conselheiro confiável”, ajudando-nos a decidir o que fazer frente a uma escolha. Para exercer tal papel, os mesmos contariam com a ajuda das vias direta e indireta que estariam ativas ao mesmo tempo. Uma vez ativa, a via direta favoreceria a escolha de uma ação com um resultado prévio positivo e a via indireta, também ativa, aconselharia contra a execução de uma ação que teve previamente um resultado negativo. Estas recomendações são então passadas, via tálamo, ao córtex motor que, por sua vez ativa o programa motor que irá orquestrar a execução desta ação.

1.1.2. MODULAÇÃO DOPAMINÉRGICA DO CIRCUITO CÓRTICO-ESTRIATAL

SNc e VTA projetam-se para o corpo estriado, exercendo importantes modulações no circuito córtico-estriatal. A SNc é um núcleo distinto da SNr, a maior parte das suas células são dopaminérgicas (NAIR-ROBERTS, *et al.*, 2008; YAMAGUCHI, *et al.*, 2013). Os neurônios da SNc de humanos possuem um pigmento escuro denominado neuromelanina que com idade acumula-se nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos ocasionando uma coloração escura, característica esta que deu origem ao nome da estrutura (FARALDI, *et al.*, 1994; YODIM, *et al.*, 1994, ZECCA, *et al.*, 2001; ZECCA, *et al.*, 2003). Os neurônios dopaminérgicos da SNc projetam-se, principalmente, para o estriado dorsal e os da VTA, principalmente, para o estriado ventral (para uma revisão veja IKEMOTO, 2007; BJÖRKLUND E DUNNETT, 2007). A dopamina, liberada pelos neurônios dopaminérgicos da SNc e VTA, modula a plasticidade sináptica córtico-estriatal por meio de duas classes de receptores acoplados à proteína G: do tipo D₁ (D₁ e D₅) e do tipo D₂ (D₂, D₃ e D₄). Os receptores do tipo D₁ ativam as proteínas G_s e G_{olf} que estimulam a enzima adenilil-ciclase, aumentando os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), os quais ativam a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). A PKA ativa diversos alvos celulares, tais como canais iônicos voltagem-dependentes e fatores de transcrição. Os receptores do tipo D₂ inibem a enzima adenilil-ciclase, diminuindo os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), levando a uma redução nos níveis de cálcio intracelular, tendo efeitos inibitórios no circuito córtico-estriatal (JACKSON e WESTLIND-DANIELSSON, 1994; BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011).

Os neurônios dopaminérgicos estimulam a via direta por meio de receptores do tipo D₁, e inibem a via indireta, por meio de receptores do tipo D₂ e, portanto, modulam todo o circuito córtico-estriatal. Ambas as ações resultam em uma modulação positiva que facilita a execução de um movimento, o que vale dizer, a dopamina é pró-movimento (DA CUNHA, *et al.*, 2009; NISHIZAWA, *et al.*, 2012). Em condições de repouso, os MSNs estão hiperpolarizados (aproximadamente -90 mV) devido à atividade de canais retificadores de potássio que estão constitutivamente ativos, isto é conhecido

como “*down state*”. Um aumento na atividade dos neurônios córtico-estriatais de forma convergente despolariza os MSNs para um estado conhecido como “*up state*”. Neste momento, inputs (entradas) excitatórios adicionais, provenientes de neurônios dopaminérgicos, facilitam, através de receptores do tipo D₁ na via direta, ou inibem, através do receptor do tipo D₂ na via indireta, o fortalecimento de sinapses córtico-estriatais promovendo ou não o desaparecimento dos MSNs (CALABRESI, *et al.*, 1996; TEPPER, e BOLAM, 2004; GERFEN e SURMEIER, 2011).

O papel da dopamina na modulação da atividade córtico-estriatal parece ser muito mais complexo. Além de ser importante na modulação da atividade córtico-estriatal do momento, a dopamina também apresenta um papel crucial na plasticidade sináptica córtico-estriatal a longo-prazo, por meio de processos conhecidos como potenciação e depressão a longo-prazo (CALABRESI, *et al.*, 2007). Na potenciação a longo-prazo (LTP), neurônios córtico-estriatais que disparam de forma sincrônica, com uma grande ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, fortalecem suas sinapses por meio da síntese de novas proteínas e inserção de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na membrana neuronal pós-sináptica. Por outro lado, na depressão a longo-prazo (LTD), neurônios córtico-estriatais que disparam fora de sincronia, portanto, com fraca ativação de receptores do tipo NMDA, levam a internalização de receptores do tipo AMPA da membrana neuronal pós-sináptica e ao enfraquecimento de suas sinapses (SIEGELBAUM e KANDEL, 1991; BEAR e MALENKA, 1994; STANTON, 1996; CALABRESI, *et al.*, 1996; CALABRESI, *et al.*, 2000; CENTONZE, *et al.*, 2001; MALENKA e BEAR, 2004). Segundo Calabresi, *et al.*, 2007, no momento “*down state*” dos MSNs a dopamina facilita a LTD nas sinapses córtico-estriatais, através da ativação de ambos os receptores D₁ e D₂, enquanto que no momento “*up state*” dos MSNs a dopamina facilita a LTP, através da ativação do receptor D₁.

Estudos eletrofisiológicos e farmacológicos mostram que a lesão da SNc de ratos com 6-hidroxidopamina leva ao desaparecimento tanto da LTP (CENTONZE, *et al.*, 1999) quanto da LTD (CALABRESI, *et al.*, 1992a; CALABRESI, *et al.*, 1992b) nas sinapses córtico-estriatais, o que demonstra o papel crítico da dopamina nestes processos. Além disso, Centonze, *et al.*, 2004, mostraram que a administração crônica, mas não aguda, do antagonista

de receptores D2 haloperidol promove a LTP. Vale destacar que esta modulação dopaminérgica da plasticidade sináptica córtico-estriatal ocorre em conjunto com outros neuromoduladores, como a acetilcolina, o óxido nítrico e os endocanabinóides (para uma revisão veja CALABRESI, *et al.*, 2007; SERGEEVA, *et al.*, 2007; LERNER e KREITZER, 2011; LOVINGER, 2012). Estas alterações sinápticas duradouras (LTP e LTD) são importantes para que as experiências possam moldar o nosso comportamento, tornando-o adequado de acordo com o contexto ambiental, e isto acontece por meio de processos chamados de aprendizagem e memória (SIEGELBAUM e KANDEL, 1991; MALENKA e BEAR, 2004; CALABRESI, *et al.*, 2007; KIM, *et al.*, 2013).

Os núcleos da base desempenham um importante papel na aprendizagem associativa de procedimentos, a qual é dividida nos chamados condicionamentos clássico (Pavloviano) e instrumental (operante). A seguir ambas as formas de condicionamento serão discutidas.

1.2. APRENDIZAGEM ASSOCIATIVA: OS CONDICIONAMENTOS CLÁSSICO E INSTRUMENTAL

Segundo Domjan (2010), a aprendizagem pode ser definida como uma “mudança duradoura nos mecanismos que controlam o comportamento, a qual é desencadeada por estímulos ou respostas específicas e que é resultado da experiência prévia com estes estímulos e respostas ou com outros similares”. A mesma está relacionada com processos reguladores básicos essenciais à homeostase, tais como a alimentação, a respiração, a regulação da temperatura e a autoproteção (VASCONCELOS, *et al.*, 2002, SMEETS, *et al.*, 2012; SCHNEIDER, 2014).

Determinados objetos e eventos no ambiente são motivacionalmente relevantes por sua importância sobre o bem-estar, sobrevivência e reprodução. Um objeto ambiental pode ser apetitivo (recompensa) ou aversivo (punição). As recompensas levam à aproximação e ao comportamento consumatório, a estados motivacionais positivos, sensação de prazer (objetos ou eventos com valores hedônicos) e aumentam a intensidade do comportamento que levou a estes objetos ou eventos. Por outro lado, objetos ou eventos aversivos levam a estados motivacionais negativos, estados emocionais de raiva, medo e pânico.

Estes levam a comportamentos de esquiva, que tem como objetivo evitar maiores danos ao organismo ameaçando sua sobrevivência e perpetuação da espécie (BALLEINE & DICKINSON, 1998; SCHULTZ, 1998; HOWER, *et al.*, 2001; BERRIDGE e KRINGELBACH, 2013).

Tradicionalmente, a aprendizagem associativa apetitiva ou aversiva, a qual envolve aprendizagem de que determinados eventos no ambiente estão relacionados, tem sido estudada a partir dos condicionamentos clássico e instrumental (MITCHELL, *et al.*, 2009). No condicionamento clássico, descoberto e caracterizado em cães pelo fisiologista russo Ivan Pavlov (1927) (MAREN, 2001; MITCHELL, *et al.*, 2009), há a associação entre um estímulo incondicionado (US, do inglês unconditioned stimulus), o qual elicitava uma resposta particular (sem ser esta treinada previamente), com um outro estímulo, inicialmente neutro (o qual não elicitava resposta alguma), mas que, depois da associação, irá eliciar uma resposta similar àquela produzida pelo estímulo incondicionado. Este segundo estímulo é conhecido como condicionado (CS, do inglês conditioned stimulus (GEWIRTZ e DAVIS, 2000; HOUWER, *et al.*, 2001; DOMJAN, 2010; MITCHELL, *et al.*, 2009; DICKINSON, 2012; DARVAS, *et al.*, 2014). Por exemplo, um estímulo incondicionado, comida ou choque, gera naturalmente uma resposta de aproximação e sensação de prazer ou de medo e esquiva, respectivamente (KIM e JUNG, 2006; HOUWER, 2007; LESANT, *et al.*, 2014). A resposta a estes US podem ser transferidas para o CS (pistas visuais, táteis, sonoras) por meio de um treinamento (aprendizagem associativa), de forma que este por si só desencadeia as respostas de aproximação ou esquiva, por exemplo (PEARCE e BOUTON, 2001; MAREN, 2005; DOMJAN, 2005). Vale ressaltar que no condicionamento clássico a resposta incondicionada e a resposta condicionada independem das ações do sujeito.

Por outro lado, no condicionamento instrumental o resultado depende das ações do sujeito. Assim, o sujeito apresenta comportamentos particulares com a finalidade de obter consequências agradáveis por meio de tais comportamentos ou evitar aquelas que são desagradáveis (DA CUNHA, *et al.*, 2009; BROMBERG-MARTIN, 2010; DA CUNHA, *et al.*, 2012; WENDLER, *et al.*, 2014). Há três eventos envolvidos na aprendizagem instrumental: o estímulo do contexto, a resposta instrumental e a consequência da resposta (BALLEINE, *et*

al., 2009; SHIFLETT, *et al.*, 2010). O psicólogo norte-americano Edward Lee Thorndike (1911), primeiro a propor a teoria do condicionamento instrumental, defendia hipótese de associação entre estímulo e resposta. Com base em seus experimentos Thorndike formulou a chamada “lei do efeito” a qual diz que se uma resposta dada na presença de um estímulo é seguida de um evento agradável, a associação entre estímulo e resposta é fortalecida. Todavia, se a resposta é seguida de um evento desagradável, a associação é enfraquecida (CATANIA, 1999; Nevin, 1999; BEELER, 2012; DA CUNHA, *et al.*, 2012). Outro pesquisador com importante participação no estudo do condicionamento instrumental foi o psicólogo Burrhus Frederic Skinner (1938), o qual propunha, diferentemente de Thorndike, a hipótese de associação entre resposta e consequência. Caso a resposta levasse a uma consequência agradável, haveria o fortalecimento daquela resposta. Mas, se a consequência fosse desagradável, haveria o enfraquecimento da respostas (AMSEL, 1992; BALLEINE & DICKINSON, 1998; BALLEINE, *et al.*, 2009). O condicionamento instrumental é dividido em dois sistemas: o mecanismo de hábito estímulo-resposta e ação direcionada a um objetivo, os quais envolvem duas formas de aprendizagem. No primeiro, a relação de contingência é entre o estímulo e a resposta, o que é conhecido como hábito, enquanto no segundo, esta relação é entre uma ação e as consequências que derivam dela, o que conhecido como ação direcionada a um objetivo (BALLEINE & DICKINSON, 1998; BALLEINE, *et al.*, 2009)

Sabe-se que o condicionamento clássico é dependente do estriado ventral (DI CHIARA, *et al.*, 2004; DAY, *et al.*, 2006; DAY, *et al.*, 2007; DAY e CARELLI, 2007; BRADFIELD e MCNALLY, 2010; SAUNDERS e ROBINSON, 2012; WENDLER, *et al.*, 2014). Por exemplo, Saunders e Robinson (2012), mostraram que a administração do antagonista dopaminérgico flupentixol no núcleo accumbens prejudicou a expressão de respostas pavlovianas condicionadas. Wendler, *et al.* (2014), demonstraram que ratos com lesão do núcleo accumbens apresentam déficits no condicionamento Pavloviano de medo. Além disso, o estriado dorsal também parece desempenhar um importante papel no condicionamento Pavloviano aversivo. White e Salinas (2003), mostraram que infusão de D-anfetamina no estriado dorsal aumenta o congelamento condicionado (conhecido em inglês como “freezing”) ao contexto

e a som na esquiiva ativa. Com relação ao condicionamento instrumental, estudos mostram que este é dependente do estriado dorsal. Evidências indicam que a aprendizagem de hábitos (associação estímulo-resposta) é dependente do estriado dorsolateral (BALLEINE e O'DOHERTY, 2010; DEVAN, *et al.*, 2011; TRICOMI, *et al.*, 2009; YIN, *et al.*, 2004) e que a ação direcionada a um objetivo é dependente do estriado dorso-medial (BALLEINE, *et al.*, 2009; YIN, *et al.*, 2005; SHIFLETT, *et al.*, 2010).

Em nossos experimentos, utilizamos o condicionamento clássico (Pavloviano) como protocolo. Nas tarefas, os ratos tinham que fazer durante o treinamento a associação entre um estímulo incondicionado (pellets de sacarose ou de quinino) e um estímulo condicionado (pistas táteis e visuais). No dia do teste os ratos tinham que usar esta aprendizagem associativa para se aproximar ou evitar determinado ambiente, dependendo se o mesmo era apetitivo ou aversivo (expressão do condicionamento clássico). No próximo tópico será discutida a importância da dopamina para a aprendizagem e memória de procedimentos.

1.3. DOPAMINA: APRENDIZAGEM E MEMÓRIA DE PROCEDIMENTOS

A via nigro-estriatal foi há mais de 50 anos identificada como sendo importante para a execução de funções motoras (EHRINGER e HORNYKIEWICZ, 1960). Entretanto, corpo crescente de evidências mostra que a dopamina também desempenha um importante papel na aquisição de memórias de procedimentos (aquelas relacionadas com as habilidades motoras e executivas necessárias para realizar uma ação). Pacientes com a doença de Parkinson, que apresentam uma perda severa de dopamina na substância negra pars compacta, como vimos, apresentam, além de déficits motores, déficits de memórias de procedimentos e de funções executivas (FOERDE e SHOHAMY, 2011; GRAHN, *et al.*, 2009; MYERS, *et al.* 2003). O papel da dopamina na aprendizagem também tem sido confirmado a partir da experimentação animal (SCHULTZ, 1998; DA CUNHA *et al.*, 2001; GEVAERD *et al.*, 2001a; GEVAERD *et al.*, 2001b; DA CUNHA, *et al.*, 2009; BROMBERG-MARTIN, *et al.*, 2010; DA CUNHA, *et al.*, 2012; DOMBROWSKI, *et al.*, 2013; SCHULTZ, 2013; DARVAS, *et al.*, 2014). Além disso, é importante ressaltar

que, como vimos acima na descrição da modulação dopaminérgica do circuito córtico-estriatal, a VTA também desempenha um importante papel na aprendizagem e memória de procedimentos (DAY, *et al.*, 2007; FIELDS, *et al.*, 2007; IKEMOTO, 2007; REDGRAVE, *et al.*, 2008; STEINBERG, *et al.*, 2013; STEINGBERG, *et al.*, 2014).

Como vimos, projeções dopaminérgicas da SNc e VTA liberam dopamina no corpo estriado. Esta liberação pode ocorrer em dois padrões: liberação tônica ou fásica (REDGRAVE, *et al.*, 2008; DREYER, *et al.*, 2010; DREYER e HOUNSGAARD, 2013). Na forma tônica, a dopamina é liberada em níveis basais de forma constante, a qual é vital para o funcionamento normal dos circuitos neurais. A liberação tônica de dopamina controla os níveis de excitabilidade dos neurônios dopaminérgicos, o que vale dizer, sua taxa de disparo, por meio de autoreceptores somatodendríticos. Essa liberação tônica parece estar envolvida no comportamento apetitivo e motor, mas isso não está muito claro (GRACE, 1991; GRACE, 1995; HAUBER, 2010; DREYER e HOUNSGAARD, 2013). Já na forma fásica, os neurônios dopaminérgicos aumentam ou diminuem drasticamente a sua taxa de disparo, causando grandes mudanças na concentração de dopamina no estriado por alguns milissegundos. A liberação fásica de dopamina é desencadeada por muitos estímulos incondicionados gratificantes, quando eles são melhores que o esperado (SCHULTZ, *et al.*, 1997; SCHULTZ, 1998; SCHULTZ, 2007), e é crucial para os processos de aprendizagem e memória mediados pela LTP e LTD (CALABRESI, 2007, REDGRAVE, *et al.*, 2008). Nesse contexto, altas taxas de dopamina estimulam comportamentos que levaram a resultados bem sucedidos, por fortalecer sinapses córtico-estriatais na via direta por meio da LTP. Por outro lado, ocorre uma inibição fásica na liberação de dopamina decorrente de ações motoras que tiveram uma consequência aversiva ou uma gratificação menor do que a esperada. Nesse caso, baixas taxas de dopamina enfraquecem sinapses entre neurônios córtico-estriatais da via direta que iniciam a ação que resultou na consequência aversiva, e isso ocorre por meio da LTD. Ocorre o oposto na via indireta: altas concentrações de dopamina enfraquecem as sinapses córtico-estriatais através da LTD, e baixas concentrações fortalecem sinapses córtico-estriatais relacionadas à ação que a precedeu por meio da LTP. (BROMBERG-MARTIN, *et al.*, 2010; HIKIDA, *et al.*,

2010; SCHULTZ, 1998; SCHULTZ, 2010). Após a aprendizagem da relação entre um estímulo condicionado e uma consequência gratificante a liberação fásica de dopamina é antecipada para o momento da apresentação do estímulo condicionado (SCHULTZ, 2007). Ocorre também a liberação fásica de dopamina frente a estímulos com alta saliência motivacional, sejam eles apetitivos ou aversivos (MATSUMOTO e HIKOSAKA, 2009). Nestes dois últimos casos, a alta liberação de dopamina aumenta a motivação do sujeito para apresentar a resposta motora apropriada ao estímulo condicionado (MIRENOWICZ e SCHULTZ, 1996; SCHULTZ, 1998; IKEMOTO, 2007; SCHULTZ, 2007; BROMBERG-MARTIN, *et al.*, 2010; HIKIDA, *et al.*, 2010; SCHULTZ, 2010; DA CUNHA, *et al.*, 2012; SHULTZ, 2013).

O papel da dopamina em processos de aprendizagem e memória parece ser muito mais complexo. Técnicas eletrofisiológicas, farmacológicas e eletroquímicas mostram que há diferentes populações de neurônios dopaminérgicos tanto na SNc quanto na VTA. Tem-se tornado cada vez mais evidente que uma subpopulação de neurônios dopaminérgicos também dispara fasicamente em resposta a estímulos aversivos ou pistas ligadas a eles, os quais desempenham um importante papel na aprendizagem aversiva. Chiodo *et. al.* (1980) encontraram duas população de neurônios na SNc, as quais chamaram de tipo A e tipo B. A população do tipo A (mais posterior) disparava fasicamente em resposta a estímulos aversivos (pressão da cauda, flashes de luz, jatos de ar no focinho, ar saturado de hidróxido de amônio), enquanto a população B (mais anterior) era inibida por estes estímulos. Além disso, também encontraram estas duas populações na VTA. Shepard e German (1988) também encontraram diferentes padrões de disparos nas partes anterior e posterior da SNc.

Em adição a estas descobertas, Mirenowicz e Schultz (1996) encontraram diferentes padrões de disparo dos neurônios dopaminérgicos em resposta a um estímulo apetitivo (suco de maçã) e a estímulos aversivos (jatos de ar na face e salina hipertônica). Uma das populações de neurônios dopaminérgicos, localizada dorsolateralmente na SNc, disparava frente aos estímulos aversivos. Mais recentemente, Matsumoto e Hikosaka (2009), também demonstraram a existência de diferentes populações de neurônios dopaminérgicos. Uma das populações, localizada na SNc ventromedial e na

parte lateral da VTA foi excitada por um estímulo apetitivo (suco de maçã) e inibida por um estímulo aversivo (jatos de ar na face). Por outro lado, a outra população, localizada dorsolateralmente na SNc e ventralmente na VTA foi excitada tanto por eventos de recompensa quanto por eventos aversivos. Em consonância com estes achados, ou seja, de que há duas populações de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo, Budyng *et. al.*, 2012, utilizando voltametria cíclica de escaneamento rápido, também demonstraram que há liberação de dopamina no estriado dorsal de ratos (amplamente innervado pela SNc) após o pinçamento de sua cauda.

Estudos realizados em nosso laboratório, com as neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA), mostram que a SNc de fato desempenha um importante papel na aprendizagem aversiva. Ratos com lesão da SNc por MPTP apresentam déficits de aprendizagem e memória na esQUIVA ativa de duas vias (GEVAERD, *et al.*, 2001a e GEVAERD, *et al.*, 2001b; DOMBROWSKI, *et al.*, 2013) e no labirinto aquático de Morris (MIYOSHI, *et al.*, 2001). Ferro, *et al.*, 2005 também mostraram que ratos com lesão da SNc por MPTP ou 6-OHDA apresentam déficits no labirinto aquático de Morris.

Com base nestes achados, de liberação fásica de dopamina em resposta tanto a estímulos apetitivos quanto aversivos, bem como da importância da dopamina nigro-estriatal para a aprendizagem associativa aversiva, decidimos testar neste trabalho a importância dos neurônios dopaminérgicos da SNc para a aprendizagem associativa envolvendo estímulos apetitivos (sacarose) e aversivos (quinino), e se as mesmas são afetadas de maneira similar pelas neurotoxinas MPTP e 6-OHDA.

2- OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar se o condicionamento clássico envolvendo estímulos apetitivos (sacarose) e aversivos (quinino) depende dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta sensíveis ao MPTP e à 6-OHDA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar se ratos tratados com MPTP ou 6-ODHA apresentam déficits de condicionamento Pavloviano de lugar com sacarose.
2. Testar se ratos tratados com MPTP ou 6-ODHA apresentam déficits de condicionamento Pavloviano de lugar com quinino.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais, métodos e resultados do trabalho encontram-se no artigo científico a seguir.

Title: Selective loss of the rat nigral dopamine neurons needed for aversive-guided learning but not reward-guided learning

Abbreviated title: Selective DA neurons for CPP and CPA in the SNc

Bernardo F. C. de Lima^{1*}, Alexander Gómez-A^{1*}, Suelen L. Boschen¹, Janaína K. Barbiero¹, Amanda M. Fiorenza², Maria A.B.F. Vital¹, Donita L. Robinson³, Charles D. Blaha⁴ & Claudio Da Cunha¹

¹Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81.530-980, PR, Brazil.

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81.530-980, PR, Brazil.

³Department of Psychiatry and Center for Alcohol Studies, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-3290, USA.

⁴Department of Psychology, The University of Memphis, 400 Innovation Drive, Memphis, TN 38152, USA.

Correspondence should be addressed to Dr. Claudio Da Cunha, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil. Email: dacunha.claudio@gmail.com

* The first and second authors made equally important contributions to this study.

Number of pages: 26

Number of figures: 4

Number of tables: 3

Number of multimedia: 0

Number of words for Abstract: 217

Number of words for Introduction: 345

Number of words for Methods: 1,741

Number of words for Results: 1,487

Number of words for Discussion: 1,121

Number of words for References: 1,431

Number of words for Figure legends: 206

Conflict of Interest: the authors have no conflict of interest to report.

Acknowledgements: The authors are grateful for the technical assistance by Gisele Oliveira, English revision by Alice Burns, and financial support from CNPq, Fundação Araucária, and CAPES.

Abstract

Recent evidence suggests that subpopulations of midbrain dopamine (DA) neurons play different roles in motivational and associative learning for rewarding and aversive stimuli. Here, we show that partial bilateral lesions of DA neurons in the rat substantia nigra pars compacta (SNc) induced by intranigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, 200 µg/side) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 3 µg/side) impaired conditioned place aversion (CPA) without affecting conditioned place preference (CPP). Control experiments demonstrated that this effect was not due to motor deficits or reduced motivation to consume sucrose or avoid quinine pellets. The neurotoxin treatments resulted in the loss of nearly 70% of DA neurons in anterior and posterior SNc and reductions in striatal DA which were similar in the MPTP- and 6-OHDA-lesioned rats. No significant loss of DA neurons was observed in the ventral tegmental area. Overall, these data suggest that: (i) there is a subpopulation of DA neurons in the SNc that is needed for aversive-guided, but not reward-guided learning; (ii) such neurons are sensitive to the toxic effects of MPTP and 6-OHDA, which makes these neurotoxins good tools to tease apart these DA neuron subpopulations. This finding has important implications in basic and applied research of Parkinson's disease, addiction, learning and memory, and other functions and conditions involving striatal DA.

Key words: dopaminergic neurons, mesencephalon, nigrostriatal pathway, neostriatum.

Introduction

Strong evidence exists that dopamine (DA) release in the striatum by neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) and the ventral tegmental area (VTA) is critical to associative learning (Schultz, 1997; Da Cunha, *et al.*, 2009; Niv, 2009; Bromberg-Martin *et al.*, 2010; Da Cunha, *et al.*, 2012; Fiorillo, *et al.*, 2013; Schultz, 2013; Lak, *et al.*, 2014). Recent studies show that two subpopulations of DA neurons exist in both the VTA and SNc: one responding with phasic activation to unexpected rewarding stimuli and with phasic inhibition to aversive stimuli; and the other responding with phasic activation to both rewarding and aversive stimuli (Ljungberg *et al.*, 1991; Mirenowicz and Schultz, 1996; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Brischoux, *et al.*, 2009; Bromberg-Martin, *et al.*, 2010; Budygin *et al.*, 2012; Berridge, 2013). DA neurons of both subpopulations were shown to be needed for learning and expression of conditioned place preference (CPP) and conditioned place aversion (CPA) (Ilango *et al.*, 2014).

Here we show for the first time that the infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the rat SNc causes selective loss of the SNc DA neurons necessary for aversive-guided learning while sparing the DA neurons necessary for reward-guided learning. MPTP and 6-OHDA are the most common neurotoxins used in animal models of Parkinson's disease. We used neurotoxin doses known to cause cognitive deficits without motor impairments (Da Cunha *et al.*, 2001; Gevaerd *et al.*, 2001a; Gevaerd *et al.*, 2001b; Perry *et al.*, 2004; Bortolanza *et al.*, 2010; Ferro, *et al.*, 2005). Lesioned and sham-operated rats were sequentially tested for CPP and CPA learning. Behavioral controls showed that the lesions did not affect locomotor functions or gustatory, hedonic responses to the appetitive and aversive stimuli. The location and specificity of the lesions were confirmed by tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry. High performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) showed reduced

content of striatal DA. The results support the view that the DA neurons that are critical for aversive-guided learning, but not those needed for reward-guided learning, were depleted from the SNc after the infusion of MPTP or 6-OHDA.

Materials and Methods

Animals

Fifty-one adult male Wistar rats of the Universidade Federal do Parana colony weighing 280-310 g at the beginning of the experiments were used. They were maintained in a temperature-controlled environment (21 ± 1 °C) on a 12/12 light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). Water was available *ad libitum*. Food (regular chow) was available *ad libitum* until 3 weeks after surgery. From this period to the end of the behavioral tests, rats were kept under food restriction to maintain 85-90% of their free-feeding body weight (White and McDonald, 1993). Body weight and water intake were monitored every 3 days.

All procedures were approved by the Ethical Committee for the use of animals of Universidade Federal do Paraná (protocol number 664) and conducted in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian law. All efforts were made in order to minimize the number of animals and pain related to experimental procedures.

Surgery

Rats were randomly assigned to 3 groups, each with 17 animals: SHAM, MPTP and 6-OHDA. Animals were anesthetized with 3 ml/kg equithesin (1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, and 3.7% ethanol in water) and fixed in a stereotaxic frame. Next, 2 µl of saline (0.9% NaCl), 200 µg MPTP (Sigma, dissolved in 2 µl of saline) or 3 µg 6-OHDA (Sigma, dissolved in 2 µl of the following solution: 8.66 g NaCl, 0.205 g KCl, 0.176 g CaCl₂·2H₂O, 0.173 g MgCl₂·6H₂O and Milli-Q water sufficient to complete a final

volume of 50 µl) was bilaterally infused into the SNc in the following coordinates: AP -5.0 mm from bregma, ML: \pm 2.1 mm from midline, DV -7.7 mm from skull, with incisor bar 3.3 mm below the interaural line (Paxinos and Watson, 2005; Dombrowski *et al.*, 2013).

Behavioral Procedures

In order to avoid a bias in the experiments, animals were tested for sucrose preference before surgery. In this test, they were placed in a Plexiglas cage for 3 consecutive days with 10 sucrose pellets each day. In the first day, animals had 15 min to eat the pellets, 10 min on the second day, and 5 min on the last day (adapted from Torras, *et al.*, 2005). Animals that were not excluded in this first test (i.e., because they ate the 10 pellets in the 3 days of test) were also given an exploratory session in the CPP/CPA apparatus in order to check for *a priori* preference for either of the 2 test compartments. In this test, animals could explore the CPP/CPA apparatus for 10 min. Animals that spent 6 min or more in a single compartment were excluded from the experiments. At the end of the experimental analyses, because animals were lost during or after surgical procedures, or due to insufficient lesions (<70% dopamine loss), the final group numbers for the open field, CPP, and CPA tests were: SHAM (n = 12), MPTP (n = 7) and 6-OHDA (n = 9). Unconditioned responses to sucrose and quinine were: SHAM (n = 5), MPTP (n = 4) and 6-OHDA (n = 4).

The open field test started 27 days after surgery. Each animal was allowed to freely explore an open field for 5 min. The field was a circular arena (100 cm diameter x 45 cm height) with concentric lines equally dividing the arena in 18 areas. The number of times the animal crossed the lines, the number of rears, and the number of grooming episodes were scored.

The CPP and CPA apparatus was a 3-compartment wooden box: two lateral compartments (each 40 in length x 22 in width x 30 in height) and a central

compartment (10 in length x 22 in width x 30 in height) separated by removable dividers (adapted from Lonstein and Fleming, 2002). The lateral compartment (the right) had tactile (textured glass floor) and visual cues (vertical stripes) and was considered appetitive (CPP) or aversive (CPA) depending on the type of pellet (sucrose or quinine). The left lateral compartment had a smooth floor and a different visual cue (horizontal stripes) and was considered neutral because it was always empty during CPP or CPA sessions or tests. CPP training started on the 28th day after surgery and continued for 6 days, followed by 1 testing day, then 6 days of extinction, and an additional testing day. CPA training started 42 days after surgery and was followed by 6 training days and 1 testing day. During this period, only one session per day was carried out. In the CPP training sessions each rat was confined for 20 min in the right (appetitive) compartment and, immediately after, confined for 20 min in the left (neutral) compartment. The appetitive compartment had 10 sucrose pellets (70 mg/pellet) and the neutral compartment was empty (no pellets). In the test session each animal was placed in the central compartment with all doors open for 20 min; time spent in each compartment was recorded. The extinction sessions were similar to the CPP sessions, except that both the right and left compartments were empty (no pellets). CPA training was identical to CPP, except that in training sessions 10 quinine pellets were placed in the right (aversive) compartment instead of sucrose pellets. The aversive pellets were made of white painted epoxy spheres, dropped in 1.5 mg/ml quinine HCl (Sigma-Aldrich) for 24 h and allowed to dry. They looked identical to the sucrose pellets. The CPP protocol used for CPP and CPA was adapted from White and McDonald (1993).

Different rats were used in the control experiments described next. They were sham-operated ($n = 5$), MPTP ($n = 4$) or 6-OHDA ($n = 4$) SNC-lesioned. Sixteen days after surgery for the SHAM operated group or 27 days after surgery for the MPTP and 6-OHDA groups, unconditioned responses to sucrose and quinine pellets were tested. Each rat was placed in a glass cylinder (20 cm diameter, 19 cm high)

within a (50 cm long, 23.5 cm wide, and 35 cm high) wooden box with mirrors on the internal walls; this allowed the animal's interaction with the pellets to be videotaped independent of the animal's position (adapted from Grill and Norgren, 1978). On the first day, each rat was given 5 min habituation inside the empty cylinder. The next day the animal was returned to the cylinder with 10 sucrose pellets on the floor. The animal was videotaped from the front and the recording time started from the moment the animal stood with 4 paws on the floor and ended 1 min after all pellets had been eaten. The following behaviors were scored: (i) time to pick up the first pellet; (ii) time interacting with all pellets (elapsed time from picking up the first pellet to finish eating the last pellet) (iii) inter-pellet intervals (elapsed time from picking up one pellet to picking up the next pellet); (iv) total time spent eating (the sum of the time spent only eating the 10 pellets); (v) number of rears; and (vi) number of grooming episodes. In addition, the number of fecal boli in the cylinder was also scored. On the 3rd day, the animals were returned to the same cylinder but with 10 quinine pellets. Because the quinine pellets could not be consumed, the following differences were made in testing and scoring: (i) the session lasted for 20 min (the mean length of the CPA training sessions); (ii) chewing behavior was scored instead of eating behavior; (iii), the number of times the animal picked up the pellets was scored instead of the number of pellets eaten.

Evaluation of the nigrostriatal lesion

After the end of the CPP and CPA tests, rats were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (140/10 mg/kg). The brains were quickly removed on ice and cut with the coronal slice approximately -4.0 mm from bregma. The anterior part of the brain was dissected to remove the striatum and stored at -80 °C for subsequent HPLC analyses; and the posterior part was processed for TH-immunohistochemistry. Concentrations of DA and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the striatum were quantified by HPLC-ED. The striatal tissue samples were homogenized with an

ultrasonic cell disrupter (Sonics, Newton, USA) in 0.1 M perchloric acid containing 0.02% sodium metabisulfite (Sigma), and 50 ng/ml of the internal standard 3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide (Sigma). After centrifugation at 10,000 g at 4°C for 30 min, 20 µl of the supernatant was injected in a HPLC system (Shimadzu) with a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 x 4.6 mm, 4 µm particle size; Phenomenex) and integrated with a coulometric electrochemical detector (ESA Coulochem III) equipped with a working electrode set at +450 mV vs. a palladium reference electrode (for details, see Dombrowski *et al.* 2013).

Midbrain samples were fixed in 4% paraformaldehyde and then cryoprotected in a 30% sucrose solution. One of every 6 coronal slices of 40 µm was collected and incubated in primary anti-TH antibody (1:500; cat # AB152 Chemicon), then transferred to a biotin-conjugated secondary antibody solution (1:200, cat # S-1000 Vector Laboratories); next it was transferred to an ABC system solution (cat # PK6101, Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories), and finally incubated with a 25 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine solution. The slices were mounted on glass slides and scanned in a motorized Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss) equipped with automated scanning VSlide (MetaSystems). TH-immunoreactive neurons were counted in all collected slices of the anterior (-4.6 to -5.2 mm from bregma) and posterior (-5.4 to -5.9 mm from bregma) SNc and VTA as determined by the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2005).

Statistical analyses

Only data of animals with more than 70% striatal dopamine loss was analyzed. Body weight, food and water intake post-surgery were analyzed by repeated measures ANOVA. Open field test parameters were analyzed by one-way ANOVA, except that grooming data was analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA due to non-normal distribution of the data. Unconditioned responses to sucrose and quinine pellets were analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple

comparison post-hoc test. Comparisons between groups for CPP and CPA data were analyzed by two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni-corrected post-hoc contrast. Number of neurons, DA and DOPAC levels were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni-corrected post-hoc contrasts. Parametric data were expressed as mean \pm SEM and non-parametric data as median (25% percentile / 75% percentile). Differences were considered significant if $p < 0.05$. Calculations were made with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software).

Results

The MPTP and 6-OHDA lesions did not affect food/water intake and exploratory behavior in an open field

Rats in the lesioned groups lost weight, ate less and drank less after surgery, but these differences diminished over the 3 weeks of recovery and no significant difference among groups was observed when CPP and CPA tests started (data not shown). MPTP and 6-OHDA rats behaved the same as the SHAM animals in the open field test. No significant difference among groups was observed for the number of crossings in the peripheral or central areas of the arena, number of rears, or number of grooming episodes (Table 1). Together, these results suggest that, by three weeks after surgery, partial lesion of the rat SNc with MPTP or 6-OHDA did not cause alterations in food/water intake, motor performance (locomotion), and anxiety (time spent in center of open field) that could affect CPP and CPA scores.

Table 1. Effect of the MPTP and 6-OHDA lesions on exploratory behavior in an open field.

	SHAM	MPTP	6-OHDA
Crossings - lateral area ^a	80.7 ± 3.7	76.7 ± 6.0	74.0 ± 6.2
Crossings - central area ^a	21.9 ± 1.7	20.4 ± 2.9	19.6 ± 1.9
Number of rears ^a	16.5 ± 2.2	11.5 ± 2.8	15.2 ± 0.9
Grooming ^b	0.0 (0.0/1.75)	0.0 (0.0/1.0)	0.0 (0.0/0.5)

^aANOVA showed no significant differences among groups in the number of crossings in both lateral ($F(2, 25) = 0.49$, $p = 0.55$) and central ($F(2, 25) = 0.34$, $p = 0.69$) areas of open field or in the number of rears ($F(2, 25) = 1.32$, $p = 0.28$), expressed as mean ± SEM. ^bKruskal-Wallis ANOVA showed no significant differences among groups in the number of groomings ($H(2, 25) = 1.27$, $p = 0.55$), expressed as median (25% percentile / 75% percentile). SHAM (n=12), MPTP (n=7), 6-OHDA (n=9).

SNc lesion induced by MPTP or 6-OHDA blocked expression of CPA but not CPP

During the habituation session carried out before CPP and CPA training no rats exhibited a preference for any of the compartments. This is based on the criterion of spending no more than 6 min in any one compartment during the 15 min habituation session (data not shown). Lesion of the SNc with MPTP or 6-OHDA did not affect CPP learning and/or memory. As shown in Fig. 1A, rats of all groups spent significantly more time in the appetitive compartment during the test session ($F(1,25) = 73.53$, $p = 0.001$; post-hoc: SHAM, $p = 0.001$; MPTP, $p = 0.01$; 6-OHDA, $p = 0.001$). Drug treatment had a marginal general effect ($F(2,25) = 3.28$, $p = 0.054$), but the

interaction treatment vs. time was not significant ($F(2,25) = 0.90$, $p = 0.41$). This preference extinguished over time; after the extinction sessions no significant differences were observed between the neutral and appetitive compartments in any group (data not shown). On the other hand, the lesion of the SNc with MPTP or 6-OHDA impaired CPA learning and/or memory. ANOVA showed a significant treatment effect ($F(2,25) = 4.10$, $p = 0.02$), a non-significant neutral vs aversive compartment effect ($F(1,25) = 0.74$, $p = 0.40$), and interaction treatment X compartment ($F(2,25) = 6.75$, $p = 0.004$) effects. Post-hoc comparisons between neutral and aversive compartments showed that, compared to the neutral compartment, the SHAM group ($p = 0.05$), but not the MPTP ($p = 1.00$) or 6-OHDA ($p = 0.73$) groups, spent significantly less time in the aversive compartment (Fig. 1B).

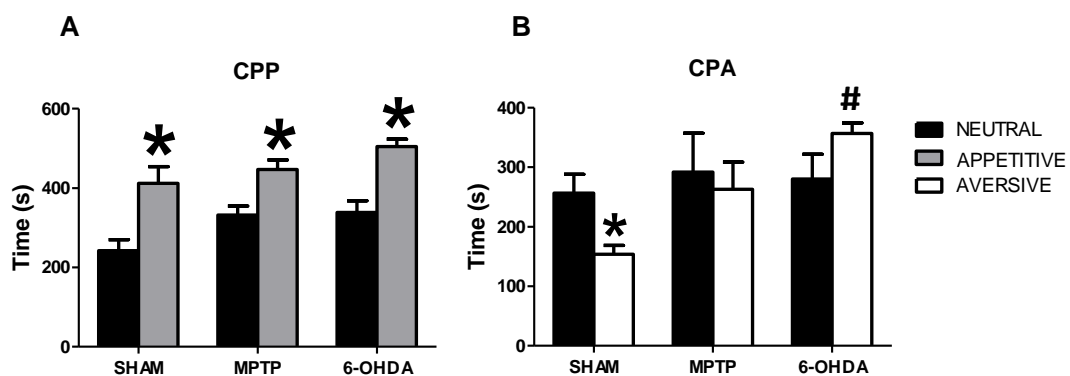


Figure 1. Effect of the SNc lesion on learning and memory of the conditioned place preference (CPP) and conditioned place aversion (CPA) tasks. Time spent in the compartment that was previously empty (neutral) or paired with sucrose (appetitive) or quinine (aversive) pellets. * $p < 0.05$, compared to the neutral compartment. # $p < 0.05$, time spent in aversive compartment, compared to the SHAM group. SHAM ($n=12$), MPTP ($n=7$), 6-OHDA ($n=9$).

Effects of the SNc lesion on unconditioned responses to sucrose and quinine

A control experiment was carried out with other groups of additional SHAM, MPTP, and 6-OHDA lesioned rats in order to test whether the neurotoxin treatments

affected hedonic responses to quinine and sucrose pellets. When access to 10 sucrose pellets was given, rats of all groups consumed all sucrose pellets. Behavioral scores for eating sucrose pellets are shown in Table 2. 6-OHDA rats took significantly longer than SHAM rats to start eating ($H(2,10) = 7.70$, $p = 0.03$; $p = 0.03$, post-hoc) and the 6-OHDA rats took more time than MPTP rats to finish eating all pellets ($H(2,10) = 7.94$, $p = 0.01$; $p = 0.01$, post hoc). On the other hand, we observed no qualitative difference in orofacial expressions (e.g., licking and tongue protrusions) of 6-OHDA, MPTP and SHAM rats after they had tasted the sucrose pellets (observations from video, data not shown). In addition, there were no significant differences in the inter-pellet intervals ($H(2,10) = 1.94$, $p = 0.37$) or total time interacting with pellets ($H(2,10) = 1.66$, $p = 0.43$). Typically they took no longer than 10 s to start eating the next pellet. Compared to MPTP rats, 6-OHDA rats exhibited significantly more grooming episodes when exposed to sucrose pellets ($H(2,10) = 8.33$, $p = 0.01$; $p = 0.01$, post-hoc). No significant difference among groups was observed in the number of fecal boli ($H(2,10) = 0.43$, $p = 0.80$), suggesting that the lesion treatment did not alter emotional responses under control of the autonomic system.

Quinine pellet data are shown in Table 3. Initially the rats approached and picked up the quinine pellet in the same way as they did for the sucrose pellets. However, immediately afterward they dropped the pellet and opened the mouth (gaping) many times even though after they were no longer manipulating the pellets. This typical orofacial expression for aversive tastes, as shown in Fig. 2, was observed in animals of all groups after they had tried the quinine pellets, and it was not observed after they ate sucrose pellets. Other aspects of pellet-directed behaviors were not different among groups as analyzed by Kruskal-Wallis ANOVA: time to start eating 1st pellet ($H(2,10) = 1.01$, $p = 0.60$); time interacting with pellets ($H(2,10) = 1.40$, $p = 0.49$); inter-pellet interval ($H(2,10) = 3.44$, $p = 0.17$); total time spent trying ($H(2,10) = 2.40$, $p = 0.30$); number of pellet pick-ups ($H(2,10) = 2.29$, $p = 0.31$).

Rearing/min ($H(2,10) = 4.89$, $p = 0.08$) and fecal boli/min ($H(2,10) = 1.02$, $p = 0.59$) were also similar across groups. The only significant difference observed was a higher number of groomings per minute by the 6-OHDA group compared to the MPTP group ($H(2, 10) = 7.98$, $p = 0.01$; $p = 0.001$, post-hoc).

Table 2. Effects of SNc lesions on unconditioned responses to sucrose pellets.

	SHAM	MPTP	6-OHDA
Time to start eating 1 st pellet (s)	47 (30/71)	121 (86/148)	275 (90/541) ^a
Time interacting with pellets (s)	77 (70/88)	105 (62/189)	96.5 (79/236)
Inter-pellet interval (s)	8.0 (7.3/9.5)	11.2 (6.5/20.6)	10.4 (8.4/25.2)
Total time spent eating (s)	52 (41/56)	35 (27/43)	67 (53/98) ^b
Number of pellet pick-ups	10	10	10
Rearings/min	5.0 (4.0/5.9)	6.0 (4.3/8.5)	3.3 (1.6/5.3)
Groomings/min	0.34 (0.28/0.35)	0.22 (0.04/0.47)	1.05 (0.65/2.19) ^b +
Fecal boli/min	0.35 (0.0/1.46)	0.57 (0.23/1.15)	0.35 (0.0/1.37)

Data are expressed as median (25% percentile / 75% percentile). ^a $p < 0.05$, compared to SHAM; ^b $p < 0.05$, compared to MPTP. SHAM (n=5), MPTP (n=4), 6-OHDA (n=4).

Table 3. Effects of SNc lesions on unconditioned responses to quinine pellets.

	SHAM	MPTP	6-OHDA
Latency to pick up 1 st pellet	29 (24/48)	23 (20/80)	71 (29/91)
Time interacting with pellets (s)	287 (186/948)	761 (445/1077)	883 (342/1086)
Inter-pellet interval (s)	45 (12/69)	42 (20/48)	69 (51/79)
Total time spent chewing (s)	44 (31/144)	168 (48/201)	40 (12/76)
Number of pellet picks-ups	17 (8/22)	23 (11/44)	14 (6/17)
Rearing/min	2.3 (1.7/2.8)	3.5 (2.9/5.5)	1.7 (1.2/3.6)
Grooming/min	0.24 (0.17/0.39)	0.17 (0.14/0.37)	0.81 (0.62/1.12) ^a
Fecal boli/min	0.00 (0.00/0.22)	0.22 (0.05/0.24)	0.12 (0.00/0.35)

Data are expressed as median (25% percentile / 75% percentile). ^a $p < 0.05$, compared to MPTP. SHAM (n=5), MPTP (n=4), 6-OHDA (n=4).



Figure 2. SNc lesion with MPTP or 6-OHDA did not affect rats' orofacial expressions after tasting quinine pellets.

Post-mortem evaluation of midbrain DA neuron loss and striatal DA depletion

As shown in Fig. 3, the MPTP and 6-OHDA rats presented significantly fewer TH-immunostained neurons than the SHAM group in the rostral SNc ($F(2,25) = 14.86$, $p = 0.001$; MPTP versus SHAM, $p = 0.003$; 6-OHDA versus SHAM, $p = 0.002$) and in the caudal SNc ($F(2,25) = 49.24$, $p = 0.0001$; MPTP versus SHAM, $p = 0.002$; 6-OHDA versus SHAM, $p = 0.001$); no significant difference was found in SNc TH immunoreactivity between the 6-OHDA and MPTP groups. In addition, no significant differences were found among groups in the number of TH-immunostained neurons in the rostral ($F(2,25) = 0.33$, $p = 0.72$, ANOVA) or caudal parts of the VTA ($F(2,22) = 0.72$, $p = 0.50$ ANOVA).

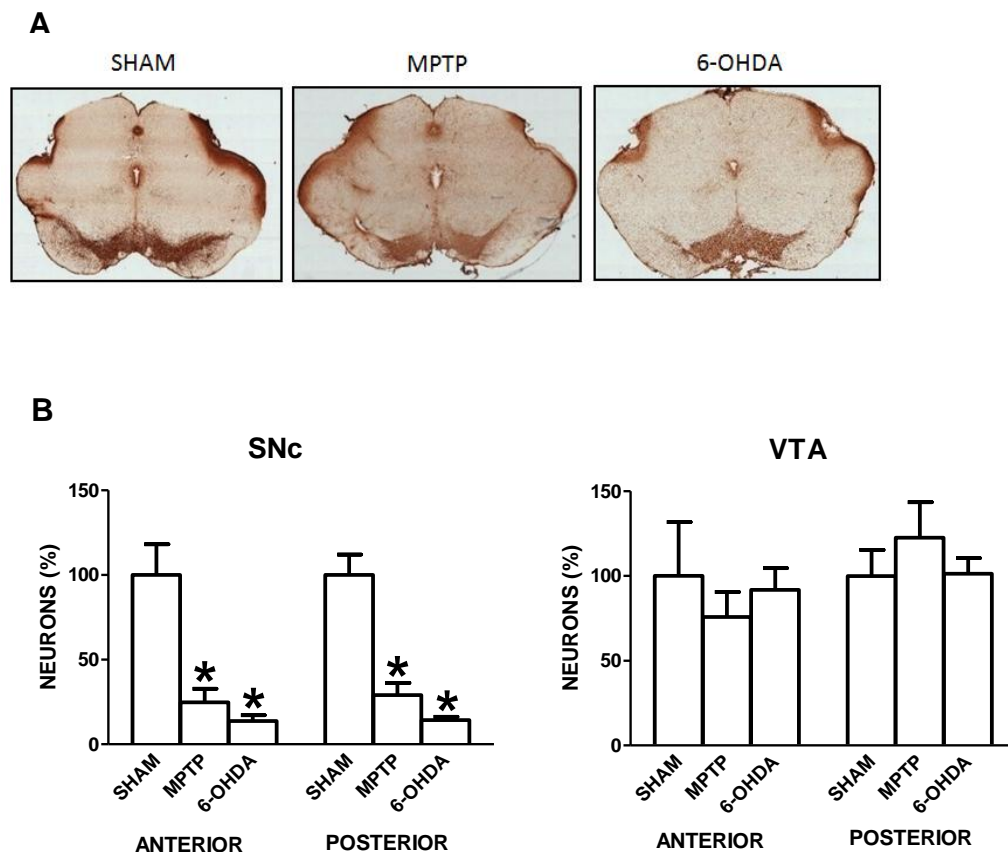


Figure 3. Effect of MPTP and 6-OHDA lesions on neuronal loss in the SNc and VTA.

(A) Brightfield photomicrographs of tyrosine hydroxylase (TH) immunostained DA neurons illustrating the appearance of a SHAM, MPTP and 6-OHDA lesion. (B) Composite counts of TH-immunostained neurons in the anterior (-4.6 to -5.2 mm from

bregma) and posterior (-5.4 to -5.9 mm from bregma) parts of the SNc and VTA, expressed as a percent of SHAM counts. * $p < 0.05$ versus SHAM. SHAM ($n=12$), MPTP ($n=7$), 6-OHDA ($n=9$).

The lesion of the SNc with MPTP or 6-OHDA also caused equivalent and significant reduction in tissue striatal levels of DA ($F(2,25) = 10.47$, $p = 0.0001$; MPTP versus SHAM, $p = 0.01$; 6-OHDA versus SHAM, $p = 0.001$) and DOPAC ($F(2,25) = 7.78$, $p = 0.02$; 6-OHDA versus SHAM) when compared to the SHAM group. DOPAC levels. The difference in DOPAC levels between MPTP and SHAM groups was only marginally significant ($p = 0.07$).

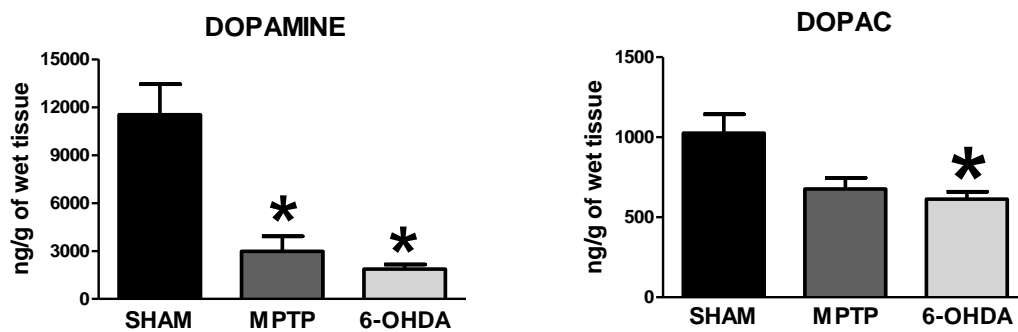


Figure 4. Post-mortem tissue levels of DA and its metabolite DOPAC in the striatum. Data expressed as mean \pm SEM and * $p < 0.05$ versus SHAM. SHAM ($n=12$), MPTP ($n=7$), 6-OHDA ($n=9$).

Discussion

The most important result of this study is the finding that infusions of MPTP or 6-OHDA into the rat SNc caused selective impairment of CPA learning but not CPP learning. This suggests that: (i) the subpopulation of SNc DA neurons that was lost after neurotoxin treatment is needed for aversive-guided learning; and (ii) the nigral DA subpopulation lost after the neurotoxin treatments is not needed for reward-guided learning. This finding is highly relevant for DA research because, to the best of

our knowledge, it is the first time that a method is offered for teasing apart two subpopulations of midbrain DA neurons that seem to be selectively implicated in aversive- and reward-guided associative learning.

A key role for nigral DA neurons in aversive- associative learning is supported by several studies. Many studies have demonstrated impaired conditioned avoidance learning in rats with SNc lesions induced by MPTP (Da Cunha *et al.*, 2001; Gevaerd *et al.*, 2001b; Gevaerd *et al.*, 2001a; Perry *et al.*, 2004; Bortolanza *et al.*, 2010) or 6-OHDA (Cooper *et al.*, 1973) and in rats with dorsal striatum lesions (Wendler *et al.*, 2014), dorsal striatum DA depletion (Rane & King, 2011), and intra-dorsolateral striatum infusion of D1 (Wietzikoski *et al.*, 2012) and D2 (Boschen *et al.*, 2011) DA receptor antagonists. A recent microdialysis study by Dombrowski *et al.* (2013) found that during conditioned avoidance learning DA release in the striatum increased only in the first trials in which rats avoided footshock but not after they had learned the task. However, no alteration in DA release was observed when the footshocks were presented in an unpredictable, unavoidable, and inescapable manner. In contrast, MPTP-lesioned rats did not learn the task. Another recent study showed that inactivation of the TH gene in dorsal striatum (and consequent lack of DA synthesis) impaired the ability of mice to learn conditioned avoidance responses (Darvas *et al.*, 2011). These studies suggest that DA is released in the striatum by SNc neurons in response to positive prediction errors (not receiving an expected shock) and promotes learning of conditioned avoidance responses.

In the present study, DA neurons of the VTA were spared in the MPTP and 6-OHDA groups. Because there is strong evidence that the activation of DA neurons in the VTA is critical for associative appetitive learning (Cheng *et al.*, 2003; Yun, *et al.*, 2004; Nicola *et al.*, 2005; Day *et al.*, 2007; Ikemoto, 2007; Berridge and Kringelbach, 2013; Ouachikh, *et al.*, 2013; Steinberg *et al.*, 2013; Steinberg *et al.*, 2014), one can hypothesize that CPP was not affected by the MPTP or 6-OHDA treatments because the VTA neurons were spared. However, it has been shown that not only VTA, but

also SNc DA neurons, are implicated in unconditioned and conditioned responses to appetitive stimuli. Mice bar-press for optical activation of either SNc DA neurons (Rossi *et al.*, 2013) or dorsal striatum neurons expressing D1 receptors (Kravits *et al.*, 2012). This suggests that DA release in the dorsal striatum has reinforcing properties. A recent study by Ilango and co-workers (2014) presented strong evidence that DA neurons of the SNc are as critical to appetitive (and aversive) associative learning as the DA neurons of the VTA. They showed that the optogenetic activation of DA neurons of the SNc sustains CPP and their inactivation sustains CPA. If the animals in the present study had presented total loss of SNc DA neurons, the results by Ilango and colleagues would be in contradiction with our finding that the MPTP and 6-OHDA rats did not present CPP impairment. However, at the doses in which these neurotoxins were used, only part of the nigral DA neurons were lost. Therefore, the most parsimonious way to reconcile Ilango *et al.* data with the present results is to speculate that the neurotoxin treatments caused selective loss of only one subpopulation of nigral DA neurons which is something to be confirmed by future electrophysiological and neurochemical studies.

Such interpretation agrees with single-cell recording studies reporting two populations of DA neurons in the SNc: the first population activated by appetitive stimuli (e.g. sucrose) and inhibited by aversive stimuli (e.g. tail pressure, air puffs, hypertonic saline, ammonium hydroxide odor, and light flashes); the second population activated by either appetitive or aversive stimuli (Chiodo *et al.*, 1980; Mirenowicz and Schultz, 1996; Matsumoto and Hikosaka, 2009). Based on these and our present findings, we speculate that the infusion of MPTP or 6-OHDA into the rat SNc might be a useful tool to tease apart DA neurons responding differently to appetitive and aversive stimuli.

In the present study, it is unlikely that the CPA impairment observed in the SNc lesioned rats was caused by motor deficits because exploratory behavior of the MPTP and 6-OHDA rats in the open field test was not altered. This agrees with

previous studies showing that 2-3 weeks after surgery no motor impairment was observed in rats with partial loss of nigral DA neurons induced by similar doses of MPTP (Da Cunha, *et al.*, 2001; Da Cunha, *et al.*, 2002; Miyoshi, *et al.*, 2002; Ho, *et al.*, 2011) or 6-OHDA (Ferro, *et al.*, 2005; Tadaiesky, *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2014). It is also unlikely that the CPA impairment was caused by reduced perception of the quinine pellets as aversive. A control experiment showed no difference between the SNc-lesioned (MPTP or 6-OHDA) rats and the control group in terms of orofacial expression after tasting quinine and any other score of manipulation of the quinine pellets. While the 6-OHDA rats presented delayed approach and consummatory behaviors to appetitive pellets, they ate all available sucrose pellets just as the MPTP and SHAM rats did, which argues against a lack of motivation or anhedonia. The 6-OHDA rats did not differ from the MPTP rats in terms of DA neurons loss, striatal dopamine depletion, and motor behavior in the open field test. However, different from the MPTP rats, the 6-OHDA rats presented a longer delay to approaching and eating the sucrose pellets compared to the control group. This could have happened because of a mild motor impairment linked to loss of monoaminergic neurons other than dopamine neurons which has been observed in some 6-OHDA treated rats (Schwartz and Huston, 1996). To support this interpretation the rats, with lesions induced by MPTP which is very selective to DA neurons (Harik *et al.*, 1987), did not delay their approach to the sucrose pellets.

In summary, this study presents strong evidence to support of the hypothesis that (i) a subpopulation of DA neurons in the SNc is needed for aversive-guided learning but not for reward-guided learning; (ii) different populations of DA neurons have different sensitivities to the toxic effects of MPTP and 6-OHDA making these neurotoxins good tools to tease apart these two DA neuron subpopulations.

References

- Berridge KC, Kringelbach, ML (2013). Neuroscience of affect: brain mechanisms of pleasure and displeasure. *Current Opinion in Neurobiology* 23: 294-303.
- Bortolanza M, Wietzikoski EC, Boschen SL, Dombrowski P, Latimer M, MacLaren DA, Winn P, Da Cunha C (2010). Functional disconnection of the substantia nigra pars compacta from the pedunculo pontine nucleus impairs learning of a conditioned avoidance task. *Neurobiology of Learning and Memory* 94:229-239.
- Boschen SL, Wietzikoski EC, Winn P, Da Cunha C (2011). The role of nucleus accumbens and dorsolateral striatal D2 receptors in active avoidance conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 96:254-262.
- Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 4894-4899.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O (2010). Dopamine neurons in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68: 815-834.
- Budygin EA, Park J, Bass CE, Grinevich VP, Bonin KD, Wightman RM (2012). Aversive stimulus differentially triggers subsecond dopamine release in reward regions. *Neuroscience* 201: 331-337.
- Cheng JJ, de Bruin JPC, Feenstra MGP (2003). Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning. *European Journal of Neuroscience* 18: 1306-1314.
- Chiodo LA, Antelman SM, Caggiula AR, Lineberry CG (1980). Sensory stimuli alter the discharge rate of dopamine (DA) neurons: evidence for two functional types of DA cells in the substantia nigra. *Brain Research* 189: 544-549.

Cooper BR, Breese GR, Grant LD, Howard JL (1973). Effects of 6-hydroxydopamine treatments on active avoidance responding: evidence for involvement of brain dopamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 185: 358-370.

Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MA, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi RN, Canteras NS (2001). Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research* 124: 9-18.

Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN (2002). The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22: 227-237.

Da Cunha C, Wietzikoski, EC, Dombrowski, PA, Bortolanza, M, Santos, LM, Boschen, SL, Miyoshi, E (2009). Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. *Behavioral Brain Research* 199: 157-170.

Da Cunha C, Gomez-A A, Blaha CD (2012). The role of the basal ganglia in motivated behavior. *Reviews in Neurosciences* 23: 747-767.

Darvas M, Fadok JP, Palmiter RD (2011). Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learning and Memory* 18: 136-143.

Day JJ, Roitman MF, Wightman RM, Carelli RM (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine in the nucleus accumbens. *Nature* 10: 1020-1028.

Dombrowski PA, Maia TV, Boschen SL, Bortolanza M, Wendler E, Schwarting RKW, Brandão ML, Winn P, Blaha CD, Da Cunha C (2013). Evidence that conditioned

avoidance responses are reinforced by positive prediction errors signaled by tonic striatal dopamine. *Behavioural Brain Research* 241: 112-119.

Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, Da Cunha C (2005). Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods* 148: 78-87.

Fiorillo CD, Yun SR, Song MR (2013). Diversity and homogeneity in responses of midbrain dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience* 33: 4693-4709.

Gevaerd MS, Takahashi RN, Silveira R, Da Cunha C (2001a). Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Research Bulletin* 55:101-106.

Gevaerd MS, Miyoshi E, Silveira R, Canteras NS, Takahashi RN, Da Cunha C (2001b). L-dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 4:361-370.

Grill HJ, Norgren R (1978). The taste reactivity test: Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Research* 143: 263-279.

Harik, S. I.; J. W. Schmidley; L. A. Iacofano; P. Blue; P. K. Arora; L. M. Sayre. (1987) On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 241: 669–676.

Ho YJ, Ho SC, Pawlak CR, Yeh KY (2011). Effects of D-cycloserine on MPTP-induced behavioral and neurological changes: potential for treatment of Parkinson's disease dementia. *Behavioural Brain Research* 219: 280-290.

Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews* 56: 27-78.

Ilango A, Kesner AJ, Keller KL, Stuber GD, Bonci A, Ikemoto S (2014). Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. *The Journal of Neuroscience* 34: 817-822.

Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience* 15: 816-818.

Lak A, Stauffer WR, Schultz W (2014). Dopamine prediction error responses integrate subjective value from different reward dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1-6.

Ljungberg T, Apicella P, Schultz W (1991). Responses of monkey midbrain dopamine neurons during delayed alternation performance. *Brain Research* 567: 337-341.

Lostein JS, Fleming AS (2002). Parental behaviors in rats and mice. *Current Protocols in Neuroscience*, chapter 8, unit 8.15: 1-8.

Matsumoto M, Hikosaka O (2009). Two types of dopamine neurons distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* 459: 837-842.

Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplessei M, Silveira R, Takahashi RN, Da Cunha C (2002). Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Research Bulletin* 58: 41-47.

Mirenowicz J, Schultz W (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* 379: 449-451.

Nicola SM, Taha SA, Kim SW, Fields HL (2005). Nucleus accumbens dopamine is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. *Neuroscience* 135: 1025-1033.

Niv Y (2009). Reinforcement learning in the brain. *Journal of Mathematical Psychology* 53: 139-154.

Ouachikh O, Dieb W, Durif F, Hafidi A (2013). Differential behavioral reinforcement effects of dopamine receptor agonists in the rat with bilateral lesion of the posterior ventral tegmental area. *Behavioural Brain Research* 252: 24-31.

Paxinos, G. & Watson, C (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier, New York.

Perry JC, Da Cunha C, Anselmo-Franci J, Andreatini R, Miyoshi E, Tufik S, Vital M (2004). Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *European Journal of Pharmacology* 484:225-233.

Rane P, King JA (2011). Exploring aversion in an animal model of pre-motor stage of Parkinson's disease. *Neuroscience* 181: 189-195.

Santiago RM, Barbiero J, Gradowski RW, Boschen S, Lima MMS, Da Cunha C, Andreatini R, Vital MABF (2014). Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behavioural Brain Research* 259: 70-77.

Schwartz RK, Huston JP (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology* 50: 275-331.

Schultz W (2013). Updating dopamine reward signals. *Current Opinion in Neurobiology* 23: 229-238.

Steinberg EE, Keiflin R, Boivin JR, Witten IB, Deisseroth K, Janak PH (2013). A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nature neuroscience* 16: 966-973.

Steinberg EE, Boivin, JR, Saunders, BT, Witten, IB, Deisseroth K, Janak, PH (2014). Positive reinforcement mediated by midbrain dopamine neurons requires d1 and d2 receptor activation in the nucleus accumbens. *PLoS One* 9: 1-9.

Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN (2008). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156: 830-840.

Torras-garcia M, Lelong J, Tronel S, Sara SJ (2005). Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learning and Memory* 12: 18-22.

Wendler E, Gaspar JCC, Ferreira TL, Barbiero JK, Andreatini R, Vital M, Blaha CD, Winn P, Da Cunha C (2014). The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: Performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiology of Learning and Memory* 109: 27-36.

White NM, McDonald, RJ (1993). Acquisition of a spatial conditioned place preference is impaired by amygdala lesions and improved by fornix lesions. *Behavioural Brain Research* 55: 269-281.

Wietzikoski EC, Boschen SL, Miyoshi E, Bortolanza M, Santos LM, Frank M, Brandão ML, Winn P, Da Cunha C (2012). Roles of D1-like dopamine receptors in the nucleus accumbens and dorsolateral striatum in conditioned avoidance response. *Psychopharmacology* 219: 159-169.

Yun IA, Wakabayashi KT, Fields HL, Nicola SM (2004). The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. *The Journal of Neuroscience* 24: 2923-2933.

4. DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostram que a infusão de MPTP ou 6-OHDA na substância negra de ratos causa uma perda parcial de neurônios dopaminérgicos que são importantes para a aprendizagem associativa da aversão condicionada de lugar, mas não da preferência condicionada de lugar. A avaliação dos animais no teste do campo aberto três semanas após a cirurgia para a infusão das neurotoxinas mostrou não haver diferenças em seu comportamento exploratório. Não houve diferença entre os grupos lesionados com MPTP ou 6-OHDA e o grupo SHAM com relação ao número de cruzamentos nos compartimentos lateral e central, o que mostra que os animais não apresentavam déficits motores ou diferenças em seus níveis de ansiedade. Não houve diferença também com relação ao levantar (número de rearings) e comportamento de autolimpeza (número de groomings). A ausência de prejuízos motores em animais lesionados por MPTP (DA CUNHA, et al., 2001; DA CUNHA, et al., 2002; MIYOSHI, et al., 2002; HO, et al., 2011) ou 6-OHDA (FERRO, et al., 2005; TADAIESKY, et al., 2008; SANTIAGO et al., 2014) está de acordo com outros trabalhos, o que demonstra serem estas neurotoxinas, nessas concentrações, bons modelos para avaliar os sintomas não-motores da doença de Parkinson.

Como dito acima, observamos que os animais apresentavam déficits de aprendizagem na tarefa aversiva (aversão condicionada de lugar), mas não na tarefa apetitiva (preferência condicionada de lugar). Dessa forma, decidimos realizar um teste adicional para avaliar se o déficit de aprendizagem na tarefa aversiva estava sendo causado porque os animais com lesão da substância negra pars compacta por MPTP ou 6-OHDA haviam deixado de entender o quinino como sendo algo aversivo. Neste teste adicional, o qual foi chamado de resposta incondicionada aos pellets de sacarose e de quinino, avaliamos parâmetros relacionados tanto com os pellets de sacarose quanto com os de quinino. Não observamos diferenças entre os grupos MPTP ou 6-OHDA e o grupo SHAM com relação às expressões faciais após experimentarem os pellets de quinino, o que mostra que o déficit aversivo não foi causado por alterações na percepção do quinino com algo aversivo, mas sim por déficits de aprendizagem associativa aversiva (associação da pista com estímulo

aversivo). Dentre os parâmetros avaliados na resposta incondicionada aos pellets de quinino (Tabela 3 dos resultados mostrados no paper), a única diferença encontrada entre os grupos foi um maior número de groomings no grupo 6-OHDA quando comparado ao grupo MPTP. Com relação à resposta incondicionada dos animais aos pellets de sacarose, diferentemente dos pellets de quinino, não observamos alteração na expressão facial dos animais após comerem os pellets de sacarose. O grupo 6-OHDA, quando comparado com o grupo SHAM, demorou mais tempo para começar a comer, e, quando comparado com o grupo MPTP, mais tempo para terminar de comer os pellets de sacarose. Entretanto, os animais 6-OHDA comeram todos os pellets de sacarose como os outros, resultado que mostra não haver uma falta de motivação ou anedonia. Além disso, este resultado pode ser devido ao fato de a 6-OHDA atingir outras populações monoaminérgicas (KIM, 2011). Os animais 6-OHDA também apresentaram um maior número de groomings (higiene) na resposta incondicionada aos pellets de sacarose.

Estudos prévios (GEVAERD, et al., 2001; GEVAERD, et al., 2001b; MIYOSHI, et al., 2001; MATSUMOTO e HIKOSAKA, 2009; BUDYING et al., 2012; DOMBROWSKI, et al., 2013) não lidaram com a seguinte questão: quais destes neurônios dopaminérgicos são críticos para a aprendizagem associativa apetitiva e aversiva? O presente estudo mostra que os neurônios dopaminérgicos da SNc que foram perdidos após o tratamento com MPTP ou 6-OHDA são críticos para a aprendizagem associativa aversiva, mas não apetitiva. A realização de estudos eletrofisiológicos e neuroquímicos dos neurônios dopaminérgicos poupados após o tratamento com MPTP ou 6-OHDA irão acrescentar dados importantes acerca do papel de diferentes populações de neurônios dopaminérgicos na aprendizagem associativa. É importante ressaltar que existe a possibilidade de que o comportamento dos animais nas tarefas apetitiva e aversiva pode ser o resultado de uma perda quantitativa e não de seletividade das neurotoxinas. Estudos optogenéticos sugerem que os neurônios da SNc também desempenham um papel na aprendizagem associativa apetitiva. Camundongos pressionam uma barra para receber ativação óptica dos neurônios dopaminérgicos da SNc (ROSSI, et al., 2013) ou dos neurônios do estriado dorsal expressando receptores D1 (KRAVITS, et al., 2012). Isso sugere que a liberação de dopamina no estriado também

égratificante. Em consonância com estes achados, Ilango, et al., (2014) mostraram que a ativação optogenética dos neurônios dopaminérgicos da SNc sustentam o PCL e que a sua inativação sustenta o ACL. Isso sugere que, no presente estudo, as neurotoxinas MPTP e 6-OHDA causaram uma perda de neurônios da SNc que são ativados por estímulos aversivos e pouparam aqueles que são ativados por estímulos apetitivos – algo que precisa ser confirmado em futuros estudos eletrofisiológicos e eletroquímicos.

No presente estudo os neurônios dopaminérgicos da VTA não foram lesionados nos grupos MPTP ou 6-OHDA. Há evidências de que a liberação de dopamina no NAc é crítica para a aprendizagem de respostas a pistas relacionadas com recompensas. Cheng et al., (2003) e Day et al., (2007) observaram que dopamina é liberada no NAc durante a aprendizagem associativa apetitiva. Nicola et al. (2005) relataram que a infusão do bloqueador da recaptação de dopamina GBR12909 no núcleo NAc aumenta as respostas a pistas preditivas de recompensas, enquanto que infusão do antagonista D1 SCH23390 as diminui. Yun et al., (2004) observaram que a injeção do antagonista D1 SCH23390 ou do antagonista D2 racloprida no NAc reduz a busca de recompensas previstas por pistas. Weinberg et al., (2011) mostraram que lesões da VTA com 6-OHDA afetam a capacidade que a grelina tem de induzir comportamentos reforçados por comida. Mais recentemente, Ouachikh, et al. (2013) observaram que ratos com lesão bilateral da VTA posterior prejudica a aprendizagem da PCL, a qual foi restabelecida após a administração de agonistas de receptor dopaminérgico no NAc. Steinberg, et al. (2013), relataram que a ativação optogenética da VTA no tempo em que uma recompensa natural é entregue ou esperada sustenta a resposta elicitada por pistas. Outro estudo recente do mesmo grupo mostra que a ativação optogenética tanto da VTA quanto do NAc é suficiente para induzir comportamentos de auto-estimulação (reforço positivo) e que a infusão de antagonistas D1 e D2 no NAc atenua a auto-estimulação da VTA (Steinberg, et al., 2014). Além disso, vários outros estudos sustentam que a VTA e o NAc são partes essenciais do sistema de recompensa do cérebro (BERRIDGE, 1996; BERRIDGE, 2003; PECIÑA, 2008; PECIÑA et al., 2006; IKEMOTO, 2007; BERRIDGE e KRINGELBACH, 2008; SMITH e HUETTEL, 2010; BERRIDGE e KRINGELBACH, 2011; BERRIDGE e KRINGELBACH, 2013).

Por fim, vale destacar que estudos clínicos mostram que pacientes com doença de Parkinson possuem impulsividade, problemas com jogos de azar (conhecido como “gambling” em inglês), déficits de aprendizagem a partir de uma ação que resulta em algo negativo (DJAMSHIDIAN, et al., 2010; CALLESEN, et al., 2013; NOMBELA, et al., 2014). Entender melhor o papel modulatório dos neurônios dopaminérgicos da SNc no circuito córtico-estriatal, sua relevância em processos de aprendizagem, memória e tomada de decisões, é fundamental para podermos estabelecer tratamentos mais eficazes para os sintomas não-motores da doença de Parkinson.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que:

1. A perda parcial de neurônios dopaminérgicos da SNc prejudica a aprendizagem associativa aversiva, mas não a apetitiva.
2. Diferentes populações de neurônios dopaminérgicos têm diferentes sensibilidades aos efeitos tóxicos do MPTP e da 6-OHDA, o que as torna boas ferramentas para segregar estas populações de neurônios dopaminérgicos.

REFERÊNCIAS

ADLER, A.; KATABI, S.; FINKES, I.; PRUT, Y.; BERGMAN, H. Different correlation patterns of cholinergic and GABAergic interneurons with striatal projection neurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 7, pp. 1-11, 2013.

AGLIOTI, S. The Role of the Thalamus and Basal Ganglia in Human Cognition. *Journal of Neurolinguistics*, vol. 10, pp. 255-265, 1997.

ALEXANDER G. E.; CRUTCHER, M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, vol. 13, pp. 266-271, 1990.

AMSEL, A. B. F. Skinner and the cognitive revolution. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, vol. 23, pp. 67-70, 1992.

ARIAS-CARRIÓN, O.; YAMADA, E.; FREUNDLIEB, N.; DJUFRI, M.; MAURER, L.; HERMANN, G.; IPACH, B.; CHIU, W. H.; STEINER, C.; OERTEL, W. H.; HÖGLINGER, G. U. Neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brains? *Journal of Neurotransmission*, vol. 73, pp. 279-285, 2009.

AZIZ, N. A.; ANGUELOVA, G. V.; MARINUS, J.; LAMMERS, G. J.; ROOS, R. A. Sleep and circadian rhythm alterations correlate with depression and cognitive impairment in Huntington's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, vol. 16, pp. 345-350, 2010.

BALDO, B. A.; PRATT, W. E.; WILL, M. J.; HANLON, E. C.; BAKSHI, V. P.; CADOR, M. Principles of motivation revealed by the diverse functions of neuropharmacological and neuroanatomical substrates underlying feeding behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 37, pp. 1985-1998, 2013.

BALLEINE, B. W.; DICKINSON, A. Goal-directed instrumental action: contingency and incentive learning and their cortical substrates. *Neuropharmacology*, vol. 37, pp. 407-419, 1998.

BALLEINE, B. W.; LILJEHOLM, M.; OSTLUND, S. B. The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behavioural Brain Research*, vol. 199, pp. 43-52, 2009.

BALLEINE, B. W.; O'DOHERTY, J. P. Human and rodent homologues in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology*, vol. 35, pp. 48-69, 2010.

BEAR, M.F.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion Neurobiology*, vol. 4, pp. 389-399, 1994.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, vol. 63, pp. 182-217, 2011.

BEELEER, J. A. Thorndike's Law 2.0: Dopamine and the Regulation of Thrift. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 6, pp. 1-12, 2012.

BERARDELLI, A.; NOTH, J.; THOMPSON, P. D.; BOLLEN, E. L.; CURRÀ, A.; DEUSCHL, G.; VAN DIJK, J. G.; TÖPPER, R.; SCHWARZ, M.; ROOS, R. A. Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Movement Disorder: Official Journal of the Movement Disorder Society*, vol. 14, pp. 398-403, 1999.

BERGSON, C.; MRZLJAK, L.; SMILEY, J. F.; PAPPY, M.; LEVENSON, R.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *The Journal of Neuroscience*, vol. 15, pp. 7821–7836, 1995.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Neuroscience of affect: brain mechanisms of pleasure and displeasure. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 23, pp. 294-303, 2013.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, vol. 30, pp. 194-202, 2007.

BOWERS, D.; MILLER, K.; MIKOS, A.; KIRSCH-DARROW, L.; SPRINGER, U.; FERNANDEZ, H.; FOOTE, K.; OKUN, M. Startling facts about emotion in Parkinson's disease: blunted reactivity to aversive stimuli. *Brain: a Journal of Neurology*, vol. 129, pp. 3356-3365, 2006.

BRADFIELD, L. A.; MCNALLY, G. P. The role of nucleus accumbens shell in learning about neutral versus excitatory stimuli during Pavlovian fear conditioning. *Learning & Memory*, vol. 17, pp. 337-343, 2010.

BROMBERG-MARTIN, E. S.; MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Dopamine neurons in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, vol. 68, pp. 815-834, 2010.

BUDYGIN, E. A.; PARK, J.; BASS, C. E.; GRINEVICH, V. P.; BONIN, K. D.; WIGHTMAN, R. M. Aversive stimulus differentially triggers subsecond dopamine release in reward regions. *Neuroscience*, vol. 201, pp. 331-337, 2012.

CALABRESI, P.; GUBELLINI, P.; CENTONZE, D.; PICCONI, B.; BERNARDI, G.; CHERGUI, K.; SVENNINGSSON, P.; FIENBERG, A. A.; GREENGARD, P. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, vol. 20, pp. 8443-8451, 2000.

CALABRESI, P.; MAJ, R.; MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. *Neuroscience Letters*, vol. 142, pp. 95-99, 1992a.

CALABRESI, P.; MAJ, R.; PISANI, A. MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *The Journal of Neuroscience*, vol.12, pp. 4224-4233, 1992b.

CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A.; DI FILIPPO, M. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, vol. 30, pp. 211-219, 2007.

CALABRESI, P.; PISANI, A.; MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, vol. 19, pp. 19-24, 1996.

CATANIA, A. Thorndike's Legacy: Learning, Selection, And The Law Of Effect. *Journal of the Experimental Analysis Behavior*, vol. 72, pp. 425-428, 1999.

CENTONZE, D.; PICCONI, B.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G. CALABRESI, P. Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 13, pp. 1071-1077, 2001.

CENTONZE, D.; USIELLO, A.; COSTA, C.; PICCONI, B.; ERBS, E.; BERNARDI, G.; BORRELLI, E.; CALABRESI, P. Chronic haloperidol promotes corticostriatal long-term potentiation by targeting dopamine D2L receptors. *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, pp. 8214-822, 2004.

CHAKRAVARTHY, V. S.; JOSEPH, D.; BAPI, R. S. What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biological Cybernetics*, vol. 103, pp. 237-253, 2010.

CHAO, J.; NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of drug addiction. *Annual Review of Medicine*, vol. 55, pp. 113-132, 2004.

CHEN, G.; CUZON, CARLSON, V. C.; WANG, J.; BECK, A.; HEINZ, A.; RON, D.; LOVINGER, D. M.; BUCK, K. J. Striatal involvement in human alcoholism

and alcohol consumption, and withdrawal in animal models. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, vol. 35, pp. 1739-1748, 2011.

CHIODO, L. A.; ANTELMAN, S. M.; CAGGIULA, A. R.; LINEBERRY, C. G. Sensory stimuli alter the discharge rate of dopamine (DA) neurons: evidence for two functional types of DA cells in the substantia nigra. *Brain Research*, vol. 189, pp. 544-549, 1980.

COOPER, B. R.; BREESE, G. R.; GRANT, L. D.; HOWARD, J. L. Effects of 6-hydroxydopamine treatments on active avoidance responding: evidence for involvement of brain dopamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 185, pp. 358-370, 1973.

CRITTENDEN, J. R.; GRAYBIEL, A. M. Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Frontiers in Neuroanatomy*, vol. 5, pp. 1-25, 2011.

CUI, G.; JUN, S.B.; JIN, X.; PHAM, MD.; VOGEL, S. S.; LOVINGER, D. M.; COSTA, R. M. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, vol. 494, pp. 238-242, 2013.

DA CUNHA C.; GEVAERD, M. S.; VITAL, M. A.; MIYOSHI, E.; ANDREATINI, R.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; CANTERAS, N. S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behavioural Brain Research*, vol. 124, pp. 9-18, 2001.

DA CUNHA, C.; GOMEZ-A, A.; BLAHA CD. The role of the basal ganglia in motivated behavior. *Reviews in the Neurosciences*, vol. 23, pp. 747-767, 2012.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E. C.; DOMBROWSKI, P.; BORTOLANZA, M.; SANTOS, L. M.; BOSHEN, S. L.; MIYOSHI, E. Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. *Behavioural Brain Research* vol. 199, pp. 157-170, 2009.

DARVAS, M.; WUNSCH, A. M.; GIBBS, J. T.; PALMITER, R. D. Dopamine dependency for acquisition and performance of Pavlovian conditioned response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, pp. 2764-2769, 2014.

DARVAS, M.; WUNSCH, A. M.; GIBBS, J. T.; PALMITER, R. D. Dopamine dependency for acquisition and performance of Pavlovian conditioned response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, pp. 2764-2769, 2014.

DAY, J. J.; CARELLI, R. M. The nucleus accumbens and Pavlovian reward learning. *The Neuroscientist*, vol. 13, pp. 148-159, 2007.

DAY, J. J.; ROITMAN, M. F.; WIGHTMAN, R. M.; CARELLI, R. M. Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine in the nucleus accumbens. *Nature*, vol. 10, pp. 1020-1028, 2007.

DAY, J. J.; ROITMAN, M. F.; WIGHTMAN, R. M.; CARELLI, R. M. Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine in the nucleus accumbens. *Nature*, vol. 10, pp. 1020-1028, 2007.

DAY, J. J.; WHEELER, R. A.; ROITMAN, M. F.; CARELLI, R. M. Nucleus accumbens neurons encode Pavlovian approach behaviors: evidence from an autoshaping paradigm. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 23, pp. 1341-1351, 2006.

DE HOUWER, J. A conceptual and theoretical analysis of evaluative conditioning. *The Spanish Journal of Psychology*, vol. 10, pp. 230-241, 2007.

DE HOUWER, J.; THOMAS, S.; BAEYENS, F. Associative learning of likes and dislikes: a review of 25 years of research on human evaluative conditioning. *Psychological Bulletin*, vol. 127, pp. 853-869, 2001.

DELONG, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, vol. 13, pp. 281-285, 1990.

DELONG, M. R.; WICHMANN, T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Neurological Review*, vol. 64, pp. 20-24, 2007.

DELONG, M.; WICHMANN, T. Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clinical EEG and Neuroscience*, vol. 41, pp. 61-67, 2010.

DEVAN, B. D.; HONG, N. S.; MCDONALD, R.J. Parallel associative processing in the dorsal striatum: segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 96, pp. 95-120, 2011.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V.; FENU, S.; DE LUCA, M. A.; SPINA, L.; CADONI, C.; ACQUAS, E.; CARBONI, E.; VALENTINI, V.; LECCA, D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, vol. 47, pp. 227-241, 2004.

DICKINSON, A. Associative learning and animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*, vol. 5, pp. 2733-2742, 2012.

DJAMSHIDIAN, A.; JHA, A.; O'SULLIVAN, S. S.; SILVEIRA-MORIYAMA, L.; JACOBSON, C.; BROWN, P.; LEES, A.; AVERBECK, B. B. Risk and learning in impulsive and nonimpulsive patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, vol. 25, pp. 2203-2210, 2010.

DIWADKAR, V. A.; BAKSHI, N.; GUPTA, G.; PRUITT, P.; WHITE, R.; EICKHOFF, S. B. Dysfunction and Dysconnection in Cortical-Striatal Networks during Sustained Attention: Genetic Risk for Schizophrenia or Bipolar Disorder and its Impact on Brain Network Function. *Frontiers in Psychiatry*, vol. 5, pp. 1-13, 2014.

DOMBROWSKI, P. A.; MAIA, T. V.; BOSCHEN, S. L.; BORTOLANZA, M.; WENDLER, E.; SCHWARTING, R. K. W.; BRANDÃO, M. L.; WINN, P.; BLAHA, C. D.; DA CUNHA, C. Evidence that conditioned avoidance responses are reinforced by positive prediction errors signaled by tonic striatal dopamine. *Behavioural Brain Research*, vol. 241, pp. 112-119, 2013.

DOMJAN, M. Pavlovian conditioning: a functional perspective. *Annual Review Psychology*, vol. 56, pp. 179-206, 2005.

DOMJAN, M. *Principios de aprendizaje y conducta*. Editora Wardsworth Cengage learning, 6ª Ed., 2010.

DOYON, J.; BELLEC, P.; AMSEL, R.; PENHUNE, V.; MONCHI, O.; CARRIER, J.; LEHÉRICY, S.; BENALI, H. Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. *Behavioural Brain Research*, vol. 199, pp. 61-75, 2009.

DREYER, J. K.; HERRIK, K. F.; BERG, R. W.; HOUNSGAARD, J. D. Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, pp. 14273-14283, 2010.

DREYER, J. K.; HOUNSGAARD, J. Mathematical model of dopamine autoreceptors and uptake inhibitors and their influence on tonic and phasic dopamine signaling. *The Journal of Neurophysiology*, vol. 171-182, 2013.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.*, vol. 38, 1236-1239, 1960.

EMOND, V.; JOYAL, C.; POISSANT, H. Structural and functional neuroanatomy of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *L'encéphale*, vol. 35, pp. 107-114, 2009.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 37, pp. 1946-1954, 2013.

FARALDI, F.; REYES, M. G.; ALFIERI, E.; LEVI, A. C. The aging substantia nigra: quantitative histologic study. *Panminerva Medica*, vol.36, pp. 103-108, 1994.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ANGELLUCCI, M. E.; CANTERAS, N. S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 148, pp. 78-87, 2005.

FIELDS, H. L.; HJELMSTAD, G. O.; MARGOLIS, E. B.; NICOLA, S. M. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 30, pp. 289-316, 2007.

FOERDE, K.; SHOHAMY, D. The role of the basal ganglia in learning and memory: insight from Parkinson's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 96, pp. 624-636, 2011.

GAMBARYAN, L. S.; SARKISYAN, Z. S. Role of the globus pallidus in the mechanisms of memory. *Neuroscience Behavioral Physiology*, vol. 13 (6), pp. 470-475, 1983.

GARCIA-RUIZ, P. J.; CHAUDHURI, K. R.; MARTINEZ-MARTIN, P. Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review...from the past. *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 338, pp. 30-33, 2014.

GERFEN, C. R.; SURMEIER, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 34, pp. 441-466, 2011.

GEVAERD, M. S.; MIYOSHI, E.; SILVEIRA, R.; CANTERAS, N. S.; TAKAHASHI, R. N.; DA CUNHA, C. L-dopa restores striatal dopamine level but fails to reverse MPTP-induced memory deficits in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, vol. 4, pp. 361-370, 2001a.

GEVAERD, M. S.; TAKAHASHI, R. N.; SILVEIRA, R.; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Research Bulletin*, vol. 55, pp. 101-106, 2001b.

GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. *Learning & Memory*, vol. 7, pp. 257-266, 2000.

Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience*, vol. 41, pp. 1-24, 1991.

Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug and Alcohol dependence*, vol. 37, pp. 111-129, 1995.

GRADIN, V. B.; KUMAR, P.; WAITER, G.; AHEARN, T.; STICKLE, C.; MILDERS, M.; REID, I.; HALL, J.; STEELE, J. D. Expected value and prediction error abnormalities in depression and schizophrenia. *Brain: a Journal of Neurology*, vol. 134, pp. 1751-1764, 2011.

GRAHN, J. A.; PARKINSON, J. A.; OWEN, A. M. The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. *Behavioural Brain Research*, vol. 199, pp. 53-60, 2009.

GRAYBIEL, A. M. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Current opinion in Neurobiology*, vol. 5, pp. 733-741, 1995.

GRAYBIEL, A. M.; AOSAKI, T.; FLAHERTY, A. W.; KIMURA, M. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, vol. 265, pp. 1826-1831, 1994.

GROENEWEGER, H. J. The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural Plasticity*, vol. 10, pp. 107-120, 2003.

HABER, S. N.; CALZAVARA, R. The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus. *Brain Research Bulletin*, vol. 78, pp. 69-74, 2009.

HARRINGTON, D. L.; LIU, D.; SMITH, M. M.; MILLS, J. A.; LONG, J. D.; AYLWARD, E. H.; PAULSEN, J. S. Neuroanatomical correlates of cognitive functioning in prodromal Huntington disease. *Brain and Behavior*, vol. 4, pp. 29-40, 2014.

HARVEY, P. O.; ARMONY, J.; MALLA, A.; LEPAGE, M. Functional neural substrates of self-reported physical anhedonia in non-clinical individuals and in patients with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, vol. 44, pp. 707-716, 2010.

HELMICH, R. C.; AARTS, E.; DE LANGE, F. P.; BLOEM, B. R.; TONI, I. Increased dependence of action selection on recent motor history in Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, pp. 6105-6113, 2009.

HERRERO, M.T.; BARCIA, C.; NAVARRO, J.M. Functional Anatomy of Thalamus and Basal Ganglia. *Child's Nervous System*, vol. 18, pp. 386-404, 2002.

HERSCH, S. M.; CILIAUX, B. J.; GUTEKUNST, C. A.; REES, H. D.; HEILMAN, C. J.; YUNG, K. K.; BOLAM, J. P.; INCE, E.; YI, H.; LEVEY, A. I. Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *The Journal of Neuroscience*, vol. 15, pp. 5222-5237, 1995.

HIKIDA, T.; KIMURA, K.; WADA, N.; FUNABIKI, K.; NAKANISHI, S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, vol. 66, pp. 896-907, 2010.

HUMPHRIES, M. D.; WOOD, R.; GURNEY, K. Reconstructing the three-dimensional GABAergic microcircuit of the striatum. *PLoS Computational Biology*, vol. 6, pp. 1-16, 2010.

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Research Reviews*, vol. 56, pp. 27-78, 2007.

JACKSON, D. M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 64, pp. 291-370, 1994.

JOEL, D. Open interconnected model of basal ganglia-thalamocortical circuitry and its relevance to the clinical syndrome of Huntington's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* vol. 16, pp. 407-423, 2001.

JOEL, D.; WEINER, I. The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated. *Neuroscience*, vol. 63, pp. 363-379, 1994.

KELLEY, A. E. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 27, pp. 765-776, 2004.

KELLEY, A. E.; BALDO, B. A.; PRATT, W. E.; WILL, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology and Behavior*, vol. 86, pp. 773-795, 2005.

KIM, B.; HAWES, S. L.; GILLANI, F.; WALLACE, L. J.; BLACKWELL, K. T. Signaling pathways involved in striatal synaptic plasticity are sensitive to temporal pattern and exhibit spatial specificity. *PLoS Computational Biology*, vol. 9, pp. 1-16, 2013.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 30, pp. 188-202, 2006.

KIRSCH-DARROW, L.; FERNANDEZ, H. H.; MARSISKE, M.; OKUN, M. S.; BOWERS, D. Dissociating apathy and depression in Parkinson disease. *Neurology*, vol. 67, pp. 33-38, 2006.

KRAVITZ, A. V.; TYE, L. D.; KREITZER, A. C. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, vol. 15, pp. 816-818, 2012.

KREITZER, A. C.; MALENKA, R. C. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron*, vol. 60, pp. 543–554, 2008.

LANGSTON, J. W.; IRWIN, I.; RICAURTE, G. A. Neurotoxins, parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 32, pp. 19-49, 1987.

LEISMAN, G.; BRAUN-BENJAMIN, O.; MELILLO, R. Cognitive-motor interactions of the basal ganglia in development. *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 8, pp. 1-18, 2014.

LERNER, T. N.; KREITZER, A. C. Neuromodulatory control of striatal plasticity and behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 21, pp. 322-327, 2011.

LOVINGER, D. M. & MATHUR, B. N. Endocannabinoids in striatal plasticity. *Parkinsonism & Related Disorders*, vol. 12, pp. 132-134, 2012.

MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, vol. 44, pp. 5-21, 2004.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 24, pp. 897-931, 2001.

MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron*, vol. 47, pp. 783-786, 2005.

MATSUI, K.; TACHIBANA, H.; YAMANISHI, T.; OGURU, M.; TODA, K.; OKUDA, B.; OKA, N. Clinical correlates of anhedonia in patients with Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, vol. 115, pp. 2524-2527, 2013.

MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, vol. 459, pp. 837-841, 2009.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies. *Brain and Cognition*, vol. 42, pp. 183-200, 2000.

MIRENOWICZ, J.; SCHULTZ, W. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*, vol. 379, pp. 449-451, 1996.

MITCHELL, C. J.; DE HOUWER, J.; LOVIBOND, P. F. The propositional nature of human associative learning. *The Behavioral and Brain Sciences*, vol. 32, pp. 183-198, 2009.

MIYACHI, S. Cortico-basal ganglia circuits--parallel closed loops and convergent/divergent connections. *Brain and Nerve*, vol. 61, pp. 351-359, 2009.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R. N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working

memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Research Bulletin*, vol. 58, pp. 41-47, 2002.

NAIR-ROBERTS, R. G.; CHATELAIN-BADIE, S. D.; BENSON, E.; WHITE-COOPER, H.; BOLAM, J. P.; UNGLESS, M. A. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, vol. 152, pp. 1024-1031, 2008.

NAKANO, K. Neural circuits and topographic organization of the basal ganglia and related regions. *Brain & Development*, vol. 22, pp. 5-16, 2000.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, vol. 8, pp. 1445-1449, 2005.

NEVIN, J. Analyzing Thorndike's Law Of Effect: The Question Of Stimulus-response Bonds. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, vol. 72, pp. 447-450, 1999.

NICOLA, S. M. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology*, vol. 191, pp. 521-550, 2007.

NICOLA, S. M.; TAHA, S. A.; KIM, S. W.; FIELDS, H. L. Nucleus accumbens dopamine is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. *Neuroscience*, vol. 135, pp. 1025-1033, 2005.

NISHIZAWA, K.; FUKABORI, R.; OKADA, K.; Kai, N.; UCHIGASHIMA, M.; WATANABE, M.; SHIOTA, A.; UEDA, M.; TSUTSUI, Y.; KOBAYASHI, K. Striatal indirect pathway contributes to selection accuracy of learned motor actions. *Journal of Neuroscience*, vol. 32, pp. 13421-13432, 2012.

NOVAK, M.J.; WARREN, J. D.; HENLEY, S. M.; DRAGANSKI, B.; FRACKOWIAK, R. S.; TABRIZI, S. J. Altered brain mechanisms of emotion

processing in pre-manifest Huntington's disease. *Brain: a Journal of Neurology*, vol. 135, pp. 1165-1179, 2012.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; BENITEZ-TEMINO, B.; BLESÁ, F. J.; GURIDI, J.; MARIN, C.; RODRIGUEZ, M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, vol. 23, pp. 548-559, 2008.

OGURU, M.; TACHIBANA, H.; TODA, K.; OKUDA, B.; OKA, N. Apathy and depression in Parkinson disease. *Journal of Geriatric psychiatry and Neurology*, vol. 23, pp. 35-41, 2010.

PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, vol. 25, pp. 563-593, 2002.

PARADISO, S.; TURNER, B. M.; PAULSEN, J. S.; JORGE, R.; PONTO, L. L.; ROBINSON, R. G. Neural bases of dysphoria in early Huntington's disease. *Psychiatry Research*, vol. 162, pp. 73-87, 2008.

PARENT, A.; HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research. Brain Research Reviews*, vol. 20, pp. 91-127, 1995.

PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, vol. 37, pp. 313-319, 2010.

PASSAROTTI, A. M.; PAVULURI, M. N. Brain functional domains inform therapeutic interventions in attention-deficit/hyperactivity disorder and pediatric bipolar disorder. *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 11, pp. 897-914, 2011.

PEARCE, J. M.; BOUTON, M. E.; Theories of associative learning in animals. *Annual Review Psychology*, vol. 52, pp. 111-139, 2001.

PECIÑA, S. Opioid reward 'liking' and 'wanting' in the nucleus accumbens. *Physiology and Behavior*, vol. 94, pp. 675-680, 2008.

PECIÑA, S.; SMITH, K. S.; BERRIDGE, K. S. Hedonic hot spots in the brain. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, vol. 12, pp. 500-511, 2006.

PERRY, J. C.; DA CUNHA, C.; ANSELMO-FRANCI, J.; ANDREATINI, R.; MIYOSHI, E.; TUFIK, S.; VITAL, M. Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *European Journal of Pharmacology*, vol. 484, pp. 225-233, 2004.

PHILLIPS, A. G.; CARR, G. D. Cognition and the basal ganglia: a possible substrate for procedural knowledge. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, vol. 14, pp. 381-385, 1987.

RANE, P.; KING, J. A. Exploring aversion in an animal model of pre-motor stage of Parkinson's disease. *Neuroscience*, vol. 181, pp. 189-195, 2011.

RAYMOND, L. A.; ANDRÉ, V. M.; CEPEDA, C.; GLADDING, C. M. MILNERWOOD AJ, LEVINE MS. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience*, vol. 198, pp. 252-273, 2011.

REDGRAVE, P.; GURNEY, K.; REYNOLDS, J. What is reinforced by phasic dopamine signals? *Brain Research Reviews*, vol. 58, pp. 322-339, 2008.

REDGRAVE, P.; VAUTRELLE, N.; REYNOLDS, J. N. Functional properties of the basal ganglia's re-entrant loop architecture: selection and reinforcement. *Neuroscience*, vol. 198, pp. 138-151, 2011.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction*, vol. 95, pp. 91-117, 2000.

ROSSI, M. A.; SUKHARNIKOVA, T.; HAYRAPETYAN, V. Y.; YANG, L.; YIN, H. H. Operant self-stimulation of dopamine neurons in the substantia nigra. *PLoS One*, vol. 8, pp. 1-7, 2013.

SANTIAGO, R. M.; BARBIERO, J.; GRADOWSKI, R. W.; BOSCHEN, S.; LIMA, M. M. S.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R. VITAL, M. A. B. F. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behavioural Brain Research*, vol. 259, pp. 70-77, 2014.

SAUNDERS, B. T.; ROBINSON, T. E. The role of dopamine in the accumbens core in the expression of Pavlovian-conditioned responses. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 36, pp. 2521-2532, 2012.

SCHNEIDER, J. E. Guest editor's introduction: Energy homeostasis in context. *Hormones and Behavior*, vol. 66, pp. 1-6, 2014.

SCHNEIDER, M.; RETZ, W.; COOGAN, A.; THOME, J.; RÖSLER, M. Anatomical and functional brain imaging in adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a neurological view. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, vol. 256, pp. 32-41, 2006.

SCHULTZ, W. Predictive reward signals of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, vol. 80, pp. 1-27, 1998.

SCHULTZ, W. Behavioral dopamine signals. *Trends in Neurosciences*, vol. 30, pp. 203-210, 2007.

SCHULTZ, W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and Brain Functions*, vol. 6, pp. 1-9, 2010.

SCHULTZ, W. Updating dopamine reward signals. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 23, pp. 229-238, 2013.

SCHULTZ, W.; DAYAN, P.; MONTAGUE, P. R. A neural substrate of prediction and reward. *Science*, vol. 275, pp. 1593-1599, 1997.

SEGER, C. A. The basal ganglia in human learning. *The Neuroscientist*, vol. 12, pp. 284-290, 2006.

SERGEEVA, O. A.; DOREULEE, N.; CHEPKOVA, A. N.; KAZMIERCZAK, T.; HAAS, H. L. Long-term depression of cortico-striatal synaptic transmission by DHPG depends on endocannabinoid release and nitric oxide synthesis. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 26, pp. 1889-1894, 2007.

SHEPARD, P. D.; GERMAN, D. C. Electrophysiological and pharmacological evidence for the existence of distinct subpopulations of nigrostriatal dopaminergic neuron in the rat. *Neuroscience*, vol. 27, 537-546, 1988.

SHIFLETT, M. W.; BROWN, R. A.; BALLEINE, B. W. Acquisition and performance of goal-directed instrumental actions depends on ERK signaling in distinct regions of dorsal striatum in rats. *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, pp. 2951-2959, 2010.

SHIFLETT, M. W.; BROWN, R. A.; BALLEINE, B. W.; Acquisition and performance of goal-directed instrumental actions depends on ERK signaling in distinct regions of dorsal striatum in rats. *The Journal Neuroscience*, vol. 30, pp. 2951-2959, 2010.

SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 1, pp. 113-120, 1991.

SMEETS, P. A.; CHARBONNIER, L.; VAN MEER, F.; VAN DER LAAN, L. N.; SPETTER, M. S. Food-induced brain responses and eating behaviour. *The Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 71, pp. 511-520, 2012.

SMITH, Y.; RAJU, D.; NANDA, B.; PARE, J. F.; GALVAN, A.; WICHMANN, T. The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Research Bulletin*, vol. 78, pp. 60-68, 2009.

STANTON, P. K. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus*, vol. 6, pp. 35-42, 1996.

STEINBERG, E. E.; BOIVIN, J. R.; SAUNDERS, B. T.; WITTEN, I. B.; DEISSEROTH, K.; JANAK, P. H. Positive reinforcement mediated by midbrain dopamine neurons requires d1 and d2 receptor activation in the nucleus accumbens. *PLoS One*, vol. 9, pp. 1-9, 2014.

STEINBERG, E. E.; KEIFLIN, R.; BOIVIN, J. R.; WITTEN, I. B.; DEISSEROTH, K.; JANAK, P. H. A causal link between prediction errors, dopamine neurons and learning. *Nature neuroscience*, vol. 16, pp. 966-973, 2013.

STRAUSS, G. P.; WALTZ, J. A.; GOLD, J. M. A review of reward processing and motivational impairment in schizophrenia. *Brain: a Journal of Neurology*, vol. 134, pp. 1751-764, 2014.

SUERMEIER, D. J. Neuroscience: To go or not go. *Nature*. Comment on Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, vol. 494, pp. 238-242, 2013.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, vol. 30, pp. 244-250, 2007.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C; TAKAHASHI, R. N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, vol. 156, pp. 830-840, 2008.

TEPPER, J. M.; BOLAM, J. P. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 14, pp. 685-692, 2004.

TISCH, S.; SILBERSTEIN, P.; LIMOUSIN-DOWSEY, P.; JAHANSHAHI, M. The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *The Psychiatric Clinics of North America*, vol. 27, pp. 757-799, 2004.

TRICOMI, E.; BALLEINE, B.W.; O'DOHERTY, J. P. A specific role for posterior dorsolateral striatum in human habit learning. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 29, pp. 2225-2232, 2009.

ÜNAL, B.; SANDOVAL, O. I.; SHAH, F.; ABERCROMBIE, E. D.; TEPPER, J. M. Distribution of tyrosine hydroxylase-expressing interneurons with respect to anatomical organization of the neostriatum. *Frontiers in Systems Neuroscience*, vol. 5, pp. 1-11, 2011.

VASCONCELOS, S. M. M.; FEITOSA, L. B.; FELIX, P. A.; AGUIAR, L. M. V.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Motivação, vias neuronais e drogas de abuso. *Revista de Psiquiatria Clínica*, vol. 29, pp. 130-134, 2002.

VETULANI, J. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Polish Journal of Pharmacology*, vol. 53, pp. 303-317, 2001.

VICTORSON, D.; CARLOZZI, N. E.; FRANK, S.; BEAUMONT, J. L.; CHENG, W.; GORIN, B.; DUH, M. S.; SAMUELSON, D.; TULSKY, D.; GUTIERREZ, S.; NOWINSKI, C. J.; MUELLER, A.; SHEN, V.; SUNG, V. Identifying Motor, Emotional-Behavioral, and Cognitive Deficits that Comprise the Triad of HD Symptoms from Patient, Caregiver, and Provider Perspectives. *Tremor and other hyperkinetic movements*, vol. 4, pp. 1-11, 2014.

VOLLSTÄDT-KLEIN, S.; WICHERT, S.; RABINSTEIN, J.; BÜHLER, M.; KLEIN, O.; ENDE, G.; HERMANN, D.; MANN, K. Initial, habitual and compulsive alcohol use is characterized by a shift of cue processing from ventral to dorsal striatum. *Addiction*, vol. 105, pp. 1741-1749, 2010.

WALTZ, J. A.; SCHWEITZER, J. B.; GOLD, J. M.; KURUP, P. K.; ROSS, T. J.; SALMERON, B. J.; ROSE, E. J.; MCCLURE, S. M.; STEIN, E. A. Patients with schizophrenia have a reduced neural response to both unpredictable and predictable primary reinforcers. *Neuropsychopharmacology*, vol. 34, pp. 1567-1577, 2009.

WEINBERG, Z. Y.; NICHOLSON, M. L.; CURRIE, P. J. 6-Hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area suppress ghrelin's ability to elicit food-reinforced behavior. *Neuroscience Letters*, vol. 499, pp. 70-73, 2011.

WENDLER, E.; GASPAR, J. C. C.; FERREIRA, T. L.; BARBIERO, J. K.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.; BLAHA, C. D.; WINN, P.; DA CUNHA, C. The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: Performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 109, pp. 27-36, 2014.

WHITE, N. M.; SALINAS, J. A. Mnemonic functions of dorsal striatum and hippocampus in aversive conditioning. *Behavioural Brain Research*, vol. 142, pp. 99-107, 2003.

WIETZIKOSKI, E. C.; BOSCHEN, S. L.; MIYOSHI, E.; BORTOLANZA, M.; SANTOS, L. M.; FRANK, M.; BRANDÃO, M. L.; WINN, P.; DA CUNHA, C. Roles of D1-like dopamine receptors in the nucleus accumbens and dorsolateral striatum in conditioned avoidance response. *Psychopharmacology*, vol. 219, pp. 159-169, 2012.

YAMANISHI, T.; TACHIBANA, H.; OGURU, M.; MATSUI, K., TODA, K.; OKUDA, B.; OKA, N. Anxiety and depression in patients with Parkinson's disease. *Internal Medicine*, vol. 52, pp. 539-545, 2013.

YAN, Z.; SURMEIER, D. J. Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 16, pp. 2592-2604, 1996.

YIN, H. H.; KNOWLTON, B. J.; BALLEINE, B. W. Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 22, pp. 505-512, 2005.

YIN, H. H.; KNOWLTON, B. J.; BALLEINE, B. W. Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *The European Journal of Neuroscience*, vol. 19, pp. 181-189, 2004.

YOUDIM, M. B.; BEN-SHACHAR, D.; RIEDERER, P. The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *Journal of Neural Transmission*, vol. 43, pp. 113-122, 1994.

YUN, I. A.; WAKABAYASHI, K. T.; FIELDS, H. L.; NICOLA, S. M. The ventral tegmental area is required for the behavioral and nucleus accumbens neuronal firing responses to incentive cues. *The Journal of Neuroscience*, vol. 12, pp. 2923-2933, 2004.

ZECCA, L.; TAMPELLINI, D.; GERLACH, M.; RIEDERER, P.; FARIELLO, R. G.; SULZER, D. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Molecular Pathology*, vol. 54, pp. 414-418, 2001.

ZECCA, L.; ZUCCA, F. A.; COSTI, P.; TAMPELLINI, D.; GATTI, A.; GERLACH, M.; RIEDERER, P.; FARIELLO, R. G.; ITO, S.; GALLORINI, M.; SULZER, D. The neuromelanin of human substantia nigra: structure, synthesis and molecular behaviour. *Jornal of Neural Transmission*, vol. 65, pp. 145-155, 2003.